

**Aus der Medizinischen Poliklinik
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke**

**Rolle der endothelialen Superoxidanionen-Produktion bei der
Pathogenese der Transplantatvaskulopathie nach
Herztransplantation:
Mechanismen zur protektiven Wirkung von Mycophenolsäure**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von
Sabine Derflinger**

**aus
München**

2008

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:	Prof. Dr. U. Pohl
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. M. Weis Prof. Dr. P.C. Weber
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv. Doz. Dr. H. Y. Sohn Priv. Doz. Dr. med. F. Krötz
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	14.02.2008

INHALTSVERZEICHNIS

A Einleitung

A.1 Die Transplantatvaskulopathie	S.3
A.2 Molekulare Grundlagen der endothelialen Dysfunktion	S.4
A.3 Endotheliale Dysfunktion im transplantierten Herzen	S.6
A.4 Zusammenhang zwischen Transplantatvaskulopathie und Immunsuppressiva	S.7
A.4.1 Die Calcineurininhibitoren Cyclosporin A und FK 506	S.7
A.4.2 Der mTOR-Inhibitor Everolimus	S.8
A.4.3 Der Antimetabolit Mycophenolsäure	S.8

B Zielsetzung

C Material und Methoden

C.1 Verwendete Geräte	S.11
C.2 Material	S.11
C.3 Zellbiologische Methoden	
C.3.1 Humane Umbilikalvenenendothelzellen	
C.3.1.1 Isolierung von humanen Umbilikalvenenendothelzellen	S.16
C.3.1.2 Kultivierung von humanen Umbilikalvenenendothelzellen	S.16
C.3.2 Isolierung von polymorphkernigen Neutrophilen	S.17
C.4 Messung der Superoxidanionen- Produktion an Endothelzellen	
C.4.1 Cytochrom C- Assay	S.17
C.4.2 DCF- Fluoreszenz	S.19
C.4.3 L-012 Chemilumineszenz	S.19
C.5 Messung der NAD(P)H- Oxidase Aktivität in Zellysaten	S.20
C.6 Messungen zur Bestimmung der Zellproliferation/vitalität	
C.6.1 MTT- Assay (Zellproliferation)	S.20
C.6.2 Trypanblau-Färbung (Zellvitalität)	S.21
C.7 Molekularbiologische Methoden	
C.7.1 Isolierung von RNA aus Endothelzellen	S.21
C.7.2 Bestimmung von Menge und Reinheit der RNA	S.22
C.7.3 Agarose Gel-Elektrophorese der RNA	S.22
C.7.4 RT-PCR	S.22
C.8 Proteinchemische Methoden	
C.8.1 Isolierung des rekombinanten PAK-PBD	S.24
C.8.2 Proteinisolierung aus HUVEC für Membranfraktionierung	S.24
C.8.3 Proteinisolierung für den Rac1 GTPase Assay	S.25
C.8.4 Proteinmengenbestimmung (BCA)	S.25
C.8.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	S.25
C.8.6 Western-Blotting (anti-Rac1)	S.26
C.9 Immunoprint	S.27
C.10 Statistische Analysen	S.27

D Ergebnisse

D.1 Effekte der Immunsuppressiva auf die endotheliale Superoxidanionen-Produktion

D.1.1 Die Calcineurininhibitoren Cyclosporin A und FK 506	
D.1.1.1 Beeinflussung der Superoxidanionen- Produktion.....	S.28
D.1.1.2 Einfluss auf die NAD(P)H- Oxidase.....	S.30
D.1.2 Einfluss des mTOR Inhibitors Everolimus auf die Superoxidanionen- Produktion...	S.32
D.1.3 Der Antimetabolit Mycophenolsäure	
D.1.3.1 Beeinflussung der Superoxidanionen-Produktion.....	S.33
D.1.3.2 Einfluss von Mycophenolsäure auf die NAD(P)H-Oxidase.....	S.34
D.1.3.3 Effekte von Mycophenolsäure auf die Proteinkinase C-vermittelte Superoxidanionen- Bildung.....	S.34
D.1.3.4 Einfluss von Mycophenolsäure auf die NAD(P)H- Oxidase in polymorphkernigen Neutrophilen.....	S.35
D.1.4 Einfluss der Immunsuppressiva auf die Zellproliferation/vitalität.....	S.36

D.2 Zelluläre Mechanismen der Mycophenolsäure- vermittelten Hemmung der ROS-Produktion

D.2.1 Expression der NAD(P)H- Oxidase- Untereinheit p22 ^{phox}	S.37
D.2.2 Wirkung von Mycophenolsäure auf Rac1 und die Rolle von Guanosin	
D.2.2.1 Effekt von Mycophenolsäure auf membrangebundenes Rac1.....	S.38
D.2.2.2 Einfluss von Mycophenolsäure auf die Rac1- Aktivität.....	S.39
D.2.2.3 Effekt von Guanosin auf die Mycophenolsäure- induzierte Hemmung von ROS.....	S.40

E Diskussion

E.1 Die NAD(P)H- Oxidase im Endothel.....	S.41
E.2 Rolle von Rac1 für die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase im Endothel..	S.42
E.3 Einfluss der Calcineurininhibitoren auf die endotheliale O ₂ ⁻ - Produktion und die NAD(P)H- Oxidase.....	S.43
E.4 Einfluss von Everolimus auf die O ₂ ⁻ - Produktion.....	S.45
E.5 Mycophenolsäure	
E.5.1 Der Wirkmechanismus von Mycophenolsäure.....	S.46
E.5.2 Die Wirkung von Mycophenolsäure auf Endothelzellen und die O ₂ ⁻ - Produktion.....	S.47

F Zusammenfassung..... S.50

G Literaturverzeichnis..... S.53

H Abkürzungsverzeichnis..... S.62

I Lebenslauf..... S.63

J Danksagung..... S.64

A Einleitung

A.1 Die Transplantatvaskulopathie

Während im ersten Jahr nach Herztransplantation (Htx) das Überleben hauptsächlich durch Infektionen und akute Abstossungsreaktionen limitiert wird, spielt nach dem ersten Jahr, neben der Bildung von Malignomen, die sogenannte Transplantatvaskulopathie (TVP) für die Prognose der Patienten die tragende Rolle. Die Inzidenz der TVP beträgt ca. 5- 10% pro Jahr (Deng 2000, Meiser 1997) und bei ca. 32-50% der Patienten konnte angiographisch in den ersten 5 Jahren nach Herztransplantation eine TVP nachgewiesen werden (Kobashigawa 2000, Meiser 1997, Taylor 2005).

Der maßgebliche Unterschied zwischen der TVP und klassischer Atherosklerose von nicht- transplantierten Patienten liegt vor allem in dem diffusen und häufig ausgedehnten Befall des gesamten Koronargefäßsystems, der sich meist in einer konzentrischen Intima-Hyperplasie manifestiert (Johnson 1989). Während die klassische Atherosklerose vor allem die proximalen Koronararterien befällt, findet man die TVP vorzugsweise in den distalen Gefäßen und deren Ästen (Weis/ von Scheidt 1997, Meiser 1997). Klinische Folgen sind stumme Infarkte, ischämische Kardiomyopathie und plötzlicher Herztod.

Bisherige Daten weisen darauf hin, dass es bei der Pathogenese der TVP initial zu einer primär immunologisch vermittelten Endothelschädigung kommt, aus der im weiteren Verlauf eine chronische Entzündung entsteht. Dies wird sowohl durch immunologische als auch durch nicht immunologische Faktoren gesteuert und führt konsekutiv zu Vasokonstriktion, Thrombozytenaktivierung, Gefäßwandentzündung und zur Proliferation glatter Muskelzellen (Hutchinson 2000, Meiser 1997, Weis/ von Scheidt 1997).

Das Verhältnis zwischen Intimaproliferation auf der einen Seite, und lumenerhaltendem Gefäßumbau, dem sogenannten „vaskulären Remodeling“ auf der anderen, entscheidet über die Entwicklung einer klinisch relevanten TVP (von Scheidt 2000). Ob auch die klassischen Risikofaktoren zur Progression der TVP beitragen, ist nicht ausreichend geklärt. Gezeigt wurde zumindest eine erhöhte Prävalenz der TVP bei Patienten mit Hyperlipoproteinämie, Hypertonie und Insulin-Resistenz (Holvoet 2000, Kato 2004, von Scheidt 2000, Winters 1990).

Da eine gezielte Therapie der TVP bisher nicht möglich ist, liegt der Schwerpunkt der medikamentösen Therapie auf der Reduktion der klassischen kardiovaskulären

Risikofaktoren und weicht somit nicht grundsätzlich von der Therapie der „klassischen“ Atherosklerose ab. Es werden vor allem ACE-Hemmer (Weis/von Scheidt 1997), der Calcium-Antagonist Diltiazem (Schroeder 1993, Mehra 1995) und Lipid- senkende Medikamente wie die HMG- CoA-Reduktase Inhibitoren eingesetzt (Kobashigawa 2004, Weis 2001, Wenke 1997). Bei ausgeprägter TVP werden betroffene Patienten durch wiederholte Koronarintervention und als ultima ratio mit einer Re- Transplantation behandelt.

Die Auswahl des Immunsuppressivums scheint auch einen wichtigen Einfluss auf die Progression der TVP zu haben (Eisen 2003, Keogh 2004, Keogh/Richardson 2004, Kobashigawa/Tobis 2004, Meiser 1993, Moien-Afshari 2003, Nickel 2006).

Mycophenolsäure sowie der Proliferationshemmer Everolimus scheinen nach neueren Daten die Progression der TVP günstig zu beeinflussen (Eisen 2003, Kaczmarek 2006, Keogh/Richardson 2004, Mancini 2003).

A.2 Molekulare Grundlagen der endothelialen Dysfunktion

Die TVP geht mit einer Verschlechterung der Endothelfunktion einher (Benvenuti 1995, Davis 1996, Hartmann 1994, Mügge 1993, Nickel 2006, Preumont 1996).

Dieser Zustand wird auch als „Endotheldysfunktion“ bezeichnet und ist pathophysiologisch als eine Verschlechterung der Stickstoffmonoxid (\bullet NO)- abhängigen Vasodilatation definiert (Cai 2000, Napoli 2001). Daher sollen zunächst die molekularen Grundlagen der \bullet NO- abhängigen Kontrolle der Vasomotion und weiterer Zellvorgänge innerhalb der Gefäßwand vorgestellt werden.

Das Autakoid \bullet NO spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Gefäßtonus und der intakten Funktion des Gefäßendothels. Durch seine vasodilatierende Wirkung wird dem \bullet NO eine wichtige Funktion in der Kontrolle des peripheren Gefäßwiderstandes zugeschrieben. \bullet NO vermindert weiterhin die Plättchenaktivierung, das Wachstum von glatten Muskelzellen sowie Fibroblasten und, durch die Inhibition der leukozytären Adhäsion und Migration, die Inflammation am Endothel (Berk 2001, Cai 2000, Marui 1993, Napoli 2001, Zafari 1998). Bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen (z.B. Koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt, cerebraler Insult) findet man typischerweise eine verminderte \bullet NO - abhängige Vasodilatation (Cai 2000, Napoli 2001).

Im Endothel wird die Bildung von \bullet NO durch die endotheliale NO- Synthase (eNOS, Typ III) katalysiert, welche konstitutiv aktiv ist (Vasquez-Vivar 1998). Ihre Aktivität

wird hauptsächlich über die intrazelluläre Ca^{++} -Konzentration reguliert (Alderton 2001). Eine Verminderung der $\bullet\text{NO}$ -Bildung kann z.B. durch eine verminderte Expression der NO-Synthase, durch einen Mangel an Substraten (z.B. L- Citrullin) und Co- Faktoren (z.B. Tetrahydrobiopterin) für die NO- Synthase, oder durch eine Verminderung der NO- Synthase- aktivierenden Signalkaskaden bedingt sein (Cai 2000, Vasquez-Vivar 1998). Die Bioverfügbarkeit von bereits gebildetem $\bullet\text{NO}$ ist andererseits abhängig von der Menge der für den oxidativen Stress verantwortlichen Sauerstoffradikale, insbesondere dem Superoxidradikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Das Superoxidradikal gehört neben dem Hydroxylradikal ($\bullet\text{OH}$) und dem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu den wichtigsten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Wolin 2002).

Die Besonderheit von $\text{O}_2^{\cdot-}$ ist, dass es die Bioverfügbarkeit des $\bullet\text{NO}$ durch die Reaktion zu Peroxynitrit deutlich senkt und somit eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion spielt (Cai 2000, Wolin 2002). Zusätzlich stellt das $\text{O}_2^{\cdot-}$ den Ausgangspunkt für die Bildung weiterer ROS/RNS dar und die aus $\text{O}_2^{\cdot-}$ gebildeten Moleküle ONOO^- und H_2O_2 scheinen durch oxidative Modifikationen direkten Einfluss auf zelluläre Signalwege auszuüben (Li 2004, Lyle 2006, Wolin 2002). Es wurden bisher mehrere enzymatische Quellen für die $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Produktion beschrieben (NAD(P)H- abhängige Oxidasen, Xanthinoxidase, mitochondriale Oxidationskette und mikrosomale Cytochrom P450 Oxidoreduktasen) (Berk 2001, Griendling 2000, Meyer 1999, Wolin 2002).

Auch die NO- Synthase selbst kann zu einer Quelle der Superoxidanionen-Produktion werden, wenn es durch Substrat- oder Kofaktorenmangel (ein Zustand, der durch die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren gefördert wird) zu einem „entkoppelten“ Zustand der NO- Synthasen kommt (Cosentino 1998, Heitzer 2000, Kitazono 1996, Vasquez-Vivar 1998). In der Gefäßphysiologie und -pathologie spielen nach bisherigen Daten jedoch NAD(P)H- Oxidasen die maßgebliche Rolle. Isoformen der NAD(P)H- Oxidase (Nox) wurden bisher in der Adventitia von Endothelzellen, in vaskulären glatten Muskelzellen und in Fibroblasten nachgewiesen (Griendling 2000, Lassègue 2003, Li 2004, Lyle 2006, Pagano 2000, Ray 2005).

A.3 Endotheliale Dysfunktion im transplantierten Herzen

Zum Nachweis einer endothelialen Dysfunktion in vivo werden in der klinischen Routine verschiedene endothelstimulierende Substanzen (v.a. Acetylcholin) verwendet (Anderson 1999). Bereits 1988 wurde entdeckt, dass es in Gefäßen von herztransplantierten Patienten zu einer paradoxen Vasokonstriktion nach Acetylcholingabe mit oder ohne Nachweis von TVP kommt (Fish 1988). Weitere Gruppen haben ebenfalls abnorme Reaktionen der Koronargefäße herztransplanterter Patienten auf verschiedene endotheliale Agonisten wie Serotonin und Substanz P beobachtet (Benvenuti 1995, Davis 1996, Hartmann 1994, Mügge 1993, Preumont 1996, Weis/Wolf 1997). Es kam zeitabhängig zur Vasokonstriktion und/oder zur Verminderung des koronaren Blutflusses. Durch intravenöse Zugabe von L- Arginin in einem frühen Stadium der TVP konnte die endotheliale Funktion kurzfristig verbessert werden, was zeigt, dass das Endothel offenbar nicht irreversibel geschädigt ist und es sich dabei um einen •NO- abhängigen Prozess handelt (Drexler 1994, Weis/Wolf 1997). In einer Serie von 45 herztransplantierten Patienten konnte mittels Angiographie, IVUS (intravaskulärer Ultraschall) und Doppleruntersuchungen gezeigt werden, dass die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion mit einer TVP assoziiert ist (Hollenberg 2004).

Es gibt weitere Hinweise auf die pathophysiologische Rolle des Ungleichgewichts zwischen Vasodilatation und Vasokonstriktion bei der TVP: Eine Verminderung von •NO, z.B. durch Reduktion der Expression der eNOS, fördert in tierexperimentellen Untersuchungen die Entwicklung der TVP (Iwata 2000, Lee 2000). Ob die Verminderung der •NO-Verfügbarkeit durch eine verstärkte Bildung von O_2^- auch in herztransplantierten Patienten signifikant zur Entwicklung von Endotheldysfunktion und TVP beiträgt, wurde bisher nicht untersucht.

A.4 Zusammenhang zwischen Transplantatvaskulopathie und Immunsuppressiva

Neuere Daten zeigen Befunde, dass die Progression der TVP durch unterschiedliche immunsuppressive Regimes erheblich beeinflusst werden kann (Eisen 2003, Kaczmarek 2006, Keogh 2004, Keogh/Richardson 2004, Kobashigawa/Tobis 2004, Meiser 1993, Moien-Afshari 2003, Nickel 2006). Hier sollen die wichtigsten Daten über den Zusammenhang zwischen der immunsuppressiven Therapie und der TVP dargestellt werden.

A.4.1 Die Calcineurininhibitoren Cyclosporin A und FK 506

Nach einer Herztransplantation wird stets eine Kombinationstherapie aus mehreren Immunsuppressiva eingesetzt, die in der Regel einen Calcineurininhibitor beinhaltet. Zusätzlich werden Corticosteroide, additiv Mycophenolsäure (MPA) (früher DNA-Synthesehemmern wie Azathioprin) und -als weitere Alternative- die mTOR-Inhibitoren Rapamycin bzw. Everolimus eingesetzt (Eisen 2004).

Der gemeinsame immunologische Wirkmechanismus der Calcineurininhibitoren Cyclosporin A und FK 506 besteht in einer Hemmung der Synthese von Zytokinen, insbesondere von Interleukin-2, und damit einer Unterdrückung der T-Zellaktivierung. Durch ihre hohe immunsuppressive Potenz stellen sie immer noch die klinisch am meisten eingesetzten Immunsuppressiva nach Herztransplantation dar. Ein Einfluss auf die Entwicklung einer TVP konnte für die Calcineurininhibitoren klinisch bisher nicht eindeutig gezeigt werden (Keogh 2004, Meiser 1993, Moien-Afshari 2003). In einer neueren Studie wurde allerdings gezeigt, dass FK 506 bezüglich einer Progression der TVP dem CsA offenbar überlegen ist (Kaczmarek 2006).

Bei der Betrachtung der pathophysiologischen Grundlagen der TVP ist allerdings auch das Nebenwirkungsprofil der Calcineurininhibitoren von Interesse:

CsA und FK 506 induzieren gehäuft eine Hypertonie und in der Regel eine Nephrotoxizität, die vermutlich durch eine Vasokonstriktion verursacht wird (Diederich 1994, Takeda 1999, Textor 1995). Es werden drei Mechanismen als Ursache für die vermehrte Vasokonstriktion durch CsA diskutiert: Eine Erhöhung des intrazellulären Calciums in glatten Muskelzellen mit einer erhöhten vasokonstriktorisches Gefäßantwort (Avdonin 1999, Nicchitta 1985, Skorecki 1992), eine vermehrte Aktivierung des sympathischen Nervensystems (Scherrer 1990, Zhang 2000) und eine vermehrte endotheliale Dysfunktion (Auch-Schwelk 1993,

Bossaller 1989, Diederich 1992). Der zuletzt genannte Mechanismus wird möglicherweise über das Endothelin- System und/oder über eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) vermittelt (Diederich 1994, Galle 2000, Lopez-Ongil 1998, Navarro-Antolin 1998).

FK 506 soll ebenfalls zu einer vermehrten endothelialen Dysfunktion führen (Textor 1995, Uchida 1998). Als Pathomechanismus wird auch hier eine vermehrte Produktion von ROS und eine vermehrte Expression von Endothelin diskutiert (Navarro-Antolin 1998, Takeda 1999, Textor 1995). Zusätzlich sind Einflüsse der Calcineurininhibitoren auf das NO- System bekannt: Die eNOS Aktivität und die Expression der eNOS im Transplantat kann durch CsA und FK 506 vermindert werden (Weis 2003). Die Kombination aus FK 506 und Azathioprin soll mit einer verminderten myokardialen eNOS- Expression und endothelialer Dysfunktion früh nach Herztransplantation assoziiert sein (Weis 2000).

A.4.2 Der mTOR-Inhibitor Everolimus

Everolimus gehört zu einer weiteren Gruppe von Immunsuppressiva, den sogenannten mTOR- Inhibitoren. Everolimus ist ein halbsynthetischer Proliferationshemmer, der gezielt als oral wirksames Medikament entwickelt wurde und in jüngster Zeit vermehrt zur immunsuppressiven Therapie eingesetzt wird (Hummel 2005). Im Unterschied zu den Calcineurininhibitoren hemmt es nicht die Produktion von Interleukinen nach der T-Zell-Aktivierung, sondern die zelluläre Proliferation durch Inhibierung von Signalwegen von Wachstumsfaktoren (Sehgal 1995).

In einer klinischen Studie wurde gezeigt, dass Everolimus die Intima-Dicke von Koronargefäßen und die Inzidenz der TVP zwölf Monate nach der Herztransplantation vermindern kann (Eisen 2003). Ursächlich hierfür wird die in experimentellen Studien gezeigte Hemmung der Proliferation von glatten Muskelzellen, die Reduktion von „vaskulärem Remodeling“ und der Intimadicke durch Everolimus vermutet (Cole 2000, Farb 2001, Matsumoto 2003, Schuurman 1999).

A.4.3 Der Antimetabolit Mycophenolsäure

Mycophenolsäure (MPA) gehört zur Gruppe der Antimetaboliten und entfaltet seine immunsuppressive Wirkung durch Hemmung des Purinmetabolismus in Lymphozyten (Allison 2000). Neben dieser immunsuppressiven Wirkung gibt es erste klinische Hinweise darauf, dass MPA die Intimadicke in Koronargefäßen herztransplanterter Patienten und somit die Inzidenz der TVP vermindern kann (Eisen 2005, Kaczmarek 2006, Kobashigawa 2005 und 2006).

Dieser Effekt könnte durch die in mehreren experimentellen Studien gezeigte gefäßprotektive und anti-inflammatorische Wirkung von MPA erklärt werden: Tierexperimentelle Daten weisen darauf hin, dass MPA Cholesterol- induzierte Atherosklerose (Romero 2000) und die Entwicklung von Hypertonus vermindern kann (Quiroz 2001, Rodriguez-Iturbe 2001). Außerdem wurde gezeigt, dass MPA die Infiltration von Leukozyten und die Intimadicke bei chronischen Abstoßungsreaktionen in Nierentransplantaten von Ratten hemmen kann (Azuma/Binder 1995). Raisanen et al. konnten nachweisen, dass MPA die Inflammation und die Proliferation von glatten Muskelzellen hemmt (Raisanen 1995). In Endothelzellen scheint MPA durch Hemmung der Expression von Adhäsionsmolekülen und verminderter Bildung von Zytokinen die Neutrophil-Endothelinteraktion zu vermindern (Huang 2005).

Inwiefern MPA die Endothelfunktion beeinflusst, insbesondere ob die Superoxidanionenproduktion moduliert wird, wurde bisher nicht untersucht.

B Zielsetzung

Das Vorliegen einer Endotheldysfunktion spielt bei der Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie pathogenetisch eine wichtige Rolle. Es wurde bisher nicht gezeigt, ob bzw. inwiefern Immunsuppressiva wie Cyclosporin A, FK 506, Everolimus und insbesondere Mycophenolsäure die endotheliale $O_2^{\cdot-}$ -Produktion und die damit verbundene endotheliale Dysfunktion beeinflussen können.

In dieser Arbeit sollte daher anhand von Zellkulturmodellen überprüft werden, ob und über welchen Mechanismus die Immunsuppressiva die $O_2^{\cdot-}$ -Produktion in Endothelzellen beeinflussen. Der Schwerpunkt wurde auf die möglicherweise endothelprotektiven Wirkung von Mycophenolsäure gelegt.

Im Einzelnen sollten folgende Fragestellungen überprüft werden:

- Welchen Einfluss haben die Immunsuppressiva Cyclosporin A, FK 506, Everolimus und Mycophenolsäure auf die $O_2^{\cdot-}$ -Bildung in Endothelzellen?
- Spielt die endotheliale NAD(P)H-Oxidase eine Rolle bei einer Veränderung der $O_2^{\cdot-}$ -Bildung durch Immunsuppressiva?
- Welche zellulären Mechanismen liegen der Wirkung von MPA auf Endothelzellen zugrunde?

C Material und Methoden

C.1 Verwendete Geräte

Mikroflow, sterile Arbeitsbank	LaminAir® Typ HB 2448	Heraeus München
Inverses Mikroskop	Typ Fluovort	FV Leitz, Wetzlar
CO ₂ Inkubator	Typ Cytoperm	Heraeus München
Magnet	MiniMACS mit MACS Trennungssäulen	Biotec GmbH
LaserScanMikroskop	410	Zeiss, Deutschland
Photometer	Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech
ElisaReader	Typ SpectraFluor	TECAN, Österreich
Lumat	LB 9507	EG&G Berthold
Power supply	Typ P25	Biometra, Göttingen
Protein-Elektrophoresekammer	MiniProteanII TM	Biorad, München
Digitaler Bilderprozessor	Typ Gel DOC 1000 mit Molecular Analyst-Software	BioRad, München
Gene Amp PCR System	2400	Perkin Elmer, Norwalk Connecticut, USA

Tab. A: verwendete Geräte

C.2 Material

Zellkultur:

- PBS⁺: Phosphat gepufferte Salzlösung mit Ca²⁺ und Mg²⁺: 160mM NaCl, 2.7mM KCl, 6.7mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄, 0.7mM CaCl₂, 0.25mM MgCl
- PBS⁻: Phosphat gepufferte Salzlösung ohne Ca²⁺ und Mg²⁺: 160mM NaCl, 2.7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄
- "Endothelial cell growth medium": Promocell Hamburg
- Dispase: 2.4U/ml in PBS⁻
- Trypsin/EDTA-Lösung: 0.05% (w/v) Trypsin, 0.02% EDTA
- Medium 199 mit 20% fetalem Kälberserum (FCS): 2.5 mM L-Glutamin, 0.006 (w/v) Penicillin, 0.013% Streptomycin
- Medium 199 mit 1% fetalem Kälberserum
- verwendetes modifiziertes Medium für die Endothelzellkultur („HUVEC-Medium“): Medium 199 mit 20% fetalem Kälberserum und 20% „Endothelial growth medium“, 0.006% (w/v) Penicillin, 0.013% Streptomycin
- DMEM: "Dulbecco's Modified Eagle's Medium" mit 15mM Hepes, Pyridoxin und Na₂CO₃; Sigma, Deisenhofen

- Puromycin
- CD 15-Antikörper
- Antikörper-Puffer: PBS⁻, 0.5% BSA, 5mM EDTA pH 7.4, entgast
- Resuspensionspuffer ohne Ca²⁺: 138mM NaCl, 2.7mM KCl, 12mM NaHCO₃, 0.4 mM NaH₂PO₄, 1mM MgCl₂ x 6H₂O, 5mM D-Glucose, 5mM HEPES
- 0,4% iges Trypanblau

Sauerstoffradikalmessungen und Zellvitalitäts- Assays:

- MTT : 5mg/ml in PBS⁺
- Saures Isopropanol (0.05N HCl)
- Cytochrom C (40μM) aufgelöst in DMEM ohne Phenolrot
- DCF (2,7dihydrodichlorofluoreszein): Stock 10mM in DMSO, weitere Verdünnung in HEPES- Tyrode- Puffer 10μM
- HEPES-Tyrode-Puffer: 135mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 0.49mM MgCl₂, 0.28mM NaH₂PO₄, 5.5mM Glucose, 20mM HEPES
- L-012 (8-amino-5-chloro-7-phenylpyridol[3,4-d]pyridazin-1,4(2H,3H)dion): Stock-Lösung 0.1M in Dimethyl-sulfoxid (DMSO), verdünnt in PBS⁻ (direkt vor jedem Versuch) zu einer Endkonzentration von 100μM
- PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat in PBS⁻, Endkonzentration 1μM
- Lysispuffer NAD(P)H- Oxidase Assay: 50mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA, 2mM Orthovanadate (Na₃VO₄), 10mM NaF, 1.5mM Na₄P₂O₇, 4mM Na₂PO₄, je 10μg/ml Leupeptin, Pepstatin, Aprotinin, 1mM PMSF, Aqua bidest
- Bradford-Reagens
- NADH: 50μM Sigma, Deisenhofen
- L-NA: N ω-Nitro L-arginin, 30μM
- SOD: Superoxiddismutase, 200U/ml, Roche Hamburg
- Guanosin: 1μM, Sigma, Deisenhofen
- DPI (Diphenyleneiodonium-Chlorid): 30μM Sigma, Deisenhofen

Molekularbiologie:

- TRIzol® Reagents mit Phenol und Guanidin Isothiozyanat-Salz
- Chloroform mit H₂O gesättigt
- DEPC-H₂O: 1ml Diethyl-Pyrocbonat (DEPC) wurde zu 11ml H₂O hinzugefügt und für 2 Stunden inkubiert
- Agarose-Gele: 1-1.5 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer; 0.5µg/ml Ethidium Bromid Lösung
- TAE-Puffer: Tris-Azetat EDTA-Puffer; 40mM Tris-Azetat, 2mM EDTA; pH 8.5
- 6x Probenpuffer (PCR): 15% (w/v) Ficoll 400, 0.05% (w/v) Bromphenolblau, 0.05% (w/v) Xylen-Cyanol
- Titan one tube rT-PCR-System:
- Enzymmix: Expand High Fidelity Enzym-Mix (Taq DNS Polymerase und Korrekturlesefähige Polymerase), reverse Transkriptase und AMV im Laufpuffer
- rT-PCR-Puffer: 5fach konzentriert mit 7.5mM MgCl₂ und DMSO
- DTT: Dithiothreit-Lösung 100mM

Primer:

- p22^{phox}: MWG Biotech AG, Ebersberg
- GAPDH: Biometra GmbH, Göttingen
- Acrylamidlösung: 40% (w/v) Acrylamid, 1% Bisacrylamid
- 4 x Trenngelpuffer: 1.5M Tris HCl, pH 8.8
- 4 x Sammelgelpuffer: 0.5M Tris HCl, pH 6.8
- 2 x Probenpuffer (SDS-Gel): 0.125M Tris HCl pH 6.8, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin, 0.02% Bromphenolblau (w/v), 200mM Mercaptoethanol, -reduzierend-
- SDS: 10% Sodiumdodecylsulfat (w/v)
- APS: 10% (w/v) Ammoniumpersulfat
- TEMED: N,N,N',N' -Tetramethylethylen-diamid
- Elektrophorese/Laufpuffer: 25mM Tris HCl pH 8.5, 192mM Glycerin, 0.1% (w/v) SDS

- Lysispuffer Membranfraktionierung: pH 7,4, 10mMTris; 1,5mM MgCl₂; 5mM KCl; 1mM DTT; 0,2mM NaVanadat; 1 Tablette Complete Mini Roche
- NETN-Puffer: 100mM NaCl, 1mM EDTA, 50mMTris HCl, 0,5% Nonidet P- 40, 1mM Phenylmethylsulfonyl Fluorid (PMSF), 5mM Benzamidin
- IPTG: Isopropyl-1 Thio-D-Galactopyranosid, 0,1mM
- Glutathion-S-Sepharose 4b Beads: Amersham Pharmacia Biotech
- Lysispuffer GTPase Assay: 1% NP-40, 25mM Hepes pH 7.5, 150mM NaCl, 10mM MgCl₂, EDTA 1mM, 10%Glycerol, 1mM PMSF, 5µg/mL Aprotinin, 1µg/mL Leupeptin
- BCA Protein Assay Kit: Pierce/Perbio Science Deutschland GmbH (Lösung A und B)
- Proteinstandard: 2mg BSA/ml H₂O
- Transferpuffer
- Blocking Puffer: 50mM Tris, 150mM NaCl, 0.03% Tweens, Milchpulver
- Waschpuffer: 50mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.5
- Waschpuffer mit Tweens: 50mM Tris, 150mM NaCl, 0.03% Tweens
- Super Signal West Pico Trial Kit von Pierce
- Anti-Rac1: Rabbit polyklonale IgG 1µg/ml Santa Cruz Biotechnology
- Anti-IgG Rabbit Peroxidase-konjugiert, verdünnt 1:100000 in Blocking Puffer
- gp91ds-*tat* wurde freundlicherweise von Dr.P.Pagano (Detroit, USA) zur Verfügung gestellt. Seine Arbeitsgruppe entwickelte dieses chimäre Peptid, welches die Interaktion von p47^{phox} mit gp91^{phox} inhibiert (Rey 2001).

Immunsuppressiva:

Mycophenolsäure (MPA): Mycophenolat Mofetil (MMF) ist das Morpholinethylester-Prodrug von Mycophenolsäure (MPA) und wird nach oraler Gabe rasch und vollständig in diesen aktiven Metaboliten umgewandelt. Bei allen Versuchen wurde MPA in den Konzentrationen von 1µM und 10µM verwendet. MPA wurde freundlicherweise von der Firma Roche Deutschland zur Verfügung gestellt.

Cyclosporin A (CsA): Das von der NOVARTIS Deutschland GmbH zur Verfügung gestellte Cyclosporin A wurde in den Konzentrationen von 1µM und 100nM verwendet.

Tacrolimus-hydrat (FK 506): FK 506 von der Firma FUJISAWA Deutschland GmbH, jetzt Astellas, wurde bei allen Versuchen in Endkonzentrationen von 1µM und 100nM verwendet.

Everolimus (RAD) (=40-O-(2-hydroxy)ethyl-Rapamycin): RAD, welches von der Firma NOVARTIS Deutschland GmbH zur Verfügung gestellt wurde, wurde in den Konzentrationen 1µM und 100nM verwendet. RAD hat auf zellulärer und molekularer Ebene denselben Wirkmechanismus wie Rapamycin. Der Unterschied liegt in den verschiedenen physikalisch-chemischen und somit pharmakokinetischen Eigenschaften (Dunn 2006).

Alle Immunsuppressiva wurden in DMSO aufgelöst und mit PBS⁻ in die entsprechenden Endkonzentrationen verdünnt.

C.3 Zellbiologische Methoden

C.3.1 Humane Umbilikalvenenendothelzellen

C.3.1.1 Isolierung von humanen Umbilikalvenenendothelzellen

Material:

- PBS⁻
- Dispase
- Medium 199
- HUVEC Medium

Humane Umbilikalvenenendothelzellen (HUVEC) wurden unter sterilen Bedingungen aus frischen Umbilikalvenen mit einer Länge von 10-15cm isoliert. Frische Humane Nabelschnüre wurden von der Universitäts-Frauenklinik München Innenstadt zur Verfügung gestellt. Beide Venenenden wurden kanüliert und die Vene wurde mit PBS⁻ durchspült. Danach wurden die Venen für 30 Minuten bei 37°C intraluminal mit Dispase inkubiert, wobei die Kanülenenden mit einem 3- Wegehahn verschlossen wurden. Durch Spülung mit 50ml Medium 199 wurden die abgelösten endothelialen Zellen in ein Falconröhrchen überführt. Nach Zentrifugation (10 Minuten mit 5000xg) wurde das Zellpellet in 12ml HUVEC-Medium resuspendiert und auf eine Zellkulturschale (Ø 10cm, effektive Wachstumsfläche pro Well: 78.5 cm²) verteilt.

C.3.1.2 Kultivierung von humanen Umbilikalvenenendothelzellen

Material:

- PBS⁻
- Trypsin/EDTA-Lösung
- HUVEC Medium

HUVEC wurden in Zellkulturschalen in HUVEC Medium bei 37°C im Inkubator bei einem Wasserdampf gesättigtem Luftgemisch mit 5% CO₂ gehalten. Nach jeweils 2 Tagen wurde das Medium erneuert. Die Subkultivierung erfolgte erst nach Erreichen des Konfluenzstadiums. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit PBS⁻ gewaschen, 2-4 Minuten mit Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert und durch leichtes Klopfen abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden dann mit HUVEC Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:2 bis 1:5 auf weitere Zellkulturschalen verteilt.

Verwendet wurden für die RNA- und Proteinisolierung Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 6cm, für die Radikal- und FACS Messungen 24 Loch-Zellkulturplatten (effektive Wachstumsfläche pro Well: 2.00cm²).

Die Versuche fanden an konfluenten HUVEC statt, die sich in Passage 2 oder 3 befanden.

C.3.2 Isolierung von Polymorphkernigen Neutrophilen

Material:

- Vollblut
- Anti- CD15 Antikörper
- Antikörper- Puffer
- Resuspensionspuffer
- Trypanblau

Das von gesunden Probanden entnommene venöse Vollblut wurde für 15 Minuten bei 1300rpm zentrifugiert, um es in die verschiedenen Bestandteile aufzutrennen. Das Plasma wurde verworfen, die Interphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit ca. 60- 100µl Antikörper bei 4°C für 15 Minuten inkubiert.

Die Trennungssäulen wurden mit entgastem Antikörper-Puffer gewaschen und mit dem Probenmaterial gefüllt. Nach nochmaligem Spülen der Säulen wurden die polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) in 2ml Antikörper-Puffer in ein Reaktionsgefäß überführt.

Zusammen mit 6ml Resuspensionspuffer wurde das Gesamte bei 1100rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das die PMN enthaltende Pellet wurde in 200µl Resuspensionspuffer aufgenommen. In der TÜRK-Zählkammer wurde die Anzahl der PMN ermittelt. Die PMN wurden unmittelbar für die weiteren Versuche verwendet.

C.4 Messung der Superoxidanionen- Produktion an Endothelzellen

C.4.1 Cytochrom C- Assay

Material:

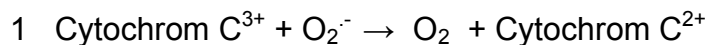
- L-NA
- MPA, CsA, FK506, Everolimus
- SOD
- Cytochrom C in DMEM

Sämtliche Versuche zur Bestimmung von $O_2^{\cdot-}$ fanden unter Hemmung der endothelialen NO- Synthase (eNOS) statt, um sowohl eine Reaktion von $\bullet NO$ mit $O_2^{\cdot-}$ zu $ONOO^-$, als auch eine $O_2^{\cdot-}$ -Bildung durch die NO- Synthase selbst, zu verhindern. Zu diesem Zweck wurden die HUVEC stets mit L- Nitro- Arginin (L-NA) 15 Minuten vorinkubiert.

Eine direkte Beeinflussung der Cytochrom C- Reduktion durch die verwendeten Substanzen wurde vor Versuchsdurchführung im zellfreien Ansatz überprüft. So konnten die Messungen von unmittelbaren Effekten von CsA, FK 506 und MPA auf die endotheliale $O_2^{\cdot-}$ -Bildung aufgrund einer direkten Reduktion des Cytochrom C^{3+} im Überstand mit diesen Substanzen nicht durchgeführt werden.

HUVEC wurden unmittelbar bzw. für 6, 24 und 48 Stunden mit den jeweiligen Immunsuppressiva in den genannten Konzentrationen inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen 2mal mit PBS⁻ gewaschen und mit Cytochrom C- Medium für 45 Minuten bei 37°C inkubiert.

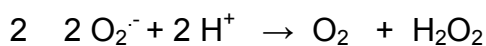
Das anfangs vorliegende Cytochrom C^{3+} (oxidierte Form) wird durch die gebildeten Superoxidradikale zu Cytochrom C^{2+} reduziert.



Diese Reduktion führt nun zu einer Absorptionzunahme, die photometrisch bei 550nm gemessen werden kann.

Da die Reduktion auch $O_2^{\cdot-}$ - unabhängig erfolgen kann, wurde bei allen Messungen der $O_2^{\cdot-}$ - Produktion in einem Vergleichsansatz das Enzym Superoxiddismutase (SOD)(200U/ml) beigegeben.

SOD katalysiert folgende Reaktion:



Die $O_2^{\cdot-}$ - spezifische Cytochrom C- Reduktion ergibt sich somit aus der Differenz der Cytochrom C- Reduktion im Reaktionsansatz ohne SOD und der Cytochrom C- Reduktion im Vergleichsansatz mit SOD. Keinen Einfluss auf diesen SOD- hemmbaren Anteil hatte das entstehende H_2O_2 , da in Kontrolluntersuchungen die Gabe von Catalase in den Vergleichsansatz mit SOD keinen Effekt zeigte.

Die Absorptionsdifferenz zwischen Reaktions- und Vergleichsansatz wurde mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten ($E_{550nm} = 2.1 \times 10^4 \text{ [mol/L]}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in nmol $O_2^{\cdot-}$ umgerechnet.

C.4.2 DCF- Fluoreszenz

Material:

- L-NA
- MPA, CsA, FK506, Everolimus
- HEPES-Tyrode-Puffer
- DCF in HEPES-Tyrode-Puffer

HUVEC wurden für die angegebenen Zeiten (6, 24, 48 Stunden) mit den Immunsuppressiva vorinkubiert und bei Versuchsbeginn einmal mit HEPES-Tyrode-Puffer gewaschen. Danach wurden sie mit Hepes- Tyrode- Puffer (incl. DCF) für 15 Minuten inkubiert. Bei den akut- Messungen wurden zusätzlich die Immunsuppressiva zugegeben. Der Farbstoff DCF (2,7 dihydrodichlorofluorescein) wird in seiner veresterten Form (DCFH-DA) eingesetzt und ist dadurch frei membranpermeabel. In der Zelle wird die unveresterte Form durch $O_2^{\cdot -}$ bzw. H_2O_2 zu fluoreszierendem DCF oxidiert. Die Fluoreszenz- Intensität von DCF wurde anschliessend am konfokalen Mikroskop bei 488nm Anregung und einer Emission von >515nm gemessen.

C.4.3 L-012 Chemilumineszenz

Material:

- MPA
- Resuspensionspuffer
- L-012
- PMA
- SOD

Nach Isolierung wurden die PMN (10 000-30 000/Küvette, gelöst in Resuspensionspuffer) für 6 Stunden bei Raumtemperatur mit MPA inkubiert. Anschliessend wurden L-012 (8-amino-5-chloro-7-phenylpyridol [3,4-d] pyridazin-1,4(2H, 3H)dion) (100µM) hinzugefügt und durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) die $O_2^{\cdot -}$ - Bildung gestartet. Die Chemilumineszenzintensität wurde mittels Luminometer erfasst. Die Messungen fanden nach 0, 5, 15 und 30 Minuten statt. Die Ergebnisse werden in relative light units (RLU/s) angegeben.

C.5 Messung der NAD(P)H- Oxidase Aktivität in Zellysaten

Material:

- MPA, CsA, FK506
- PBS⁻
- Trypsin
- Medium 199 mit 20% FCS
- Lysispuffer
- Cytochrom C in Reaktionspuffer
- NADH
- SOD

Für die Messung einer zellulären NAD(P)H- abhängigen $O_2^{\cdot-}$ - Produktion wurden die Endothelzellen lysiert und nach Zugabe von NADH zum Zellysatz die Superoxidanionen-Produktion gemessen. Dazu wurden zuerst die mit den Immunsuppressiva vorinkubierten HUVEC 2 mal mit PBS⁻ gewaschen und durch Inkubation mit Trypsin abgelöst. Die gelösten Zellen wurden in Medium 199 aufgenommen und 7 Minuten bei 2000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde 2 mal mit PBS⁻ (7Minuten bei 2000rpm) gewaschen und in 500µl Lysispuffer suspendiert. Nach Bestimmung der Proteinmenge (nach BRADFORD) wurde in jede Messküvette Cytochrom C- Lösung (Endkonzentration 40µM), 10µg Protein des Zell- Lysats, SOD (zur Hälfte der Proben) und NADH zum Starten der Reaktion gegeben. Die NAD(P)H- abhängige $O_2^{\cdot-}$ - Bildung wurde, wie im Abschnitt C.4.1 beschrieben, mittels Photometrie bestimmt.

C.6 Messungen zur Bestimmung der Zellproliferation/vitalität

C.6.1 MTT- Assay (Zellproliferation)

Material:

- MPA, CsA, FK 506,
- Medium 199 mit 1% Serum
- PBS⁺
- MTT-Lösung
- Saures Isopropanol

Konfluente und nicht konfluente HUVECs wurden für 24 Stunden mit den Immunsuppressiva in den üblichen Konzentrationen vorinkubiert. Die Zellen wurden dann mit frischem Medium incl. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium Bromid) (Endkonzentration 0,5mg/ml) für 2 Stunden bei 37° inkubiert. Das gelöste MTT enthält einen Tetrazoliumring, der durch die in lebenden Zellen aktiven mitochondrialen Dehydrogenasen zu purpurfarbenem Formazan

gespalten wird. Nach zweimaligem Waschen mit PBS⁺ wurde das gebildete Formazan durch Zugabe von mit HCl angesäuertem Isopropanol sichtbar gemacht. Durch Abnehmen des Überstands in eine Küvette konnte so im Photometer bei 560nm (dem Absorptionsmaximum des gebildeten Formazans) und 630nm (unspezifische Absorptionen der Zelllösung) die Absorption gemessen werden, die proportional zur Menge des Formazans war. Somit konnte auf das Zellwachstum geschlossen werden.

C.6.2 Trypanblau- Färbung (Zellvitalität)

Material:

- MPA, CsA, FK 506, Everolimus
- 0,4%iges Trypan Blau (4mg/ml H₂O)
- PBS⁺

Nach der Vorinkubation von konfluenten HUVEC für 24 Stunden mit den verwendeten Immunsuppressiva und 2 Waschschritten (PBS⁺), wurden die Zellen für 2-5 Minuten mit Trypanblau inkubiert. Nach nochmaligem Waschen der Zellen mit PBS⁺ wurde in definierten Bereichen der TÜRK- Zählkammer die Anzahl der blau gefärbten Zellen bestimmt (als Maß für den Anteil der nicht mehr vitalen Zellen).

C.7 Molekularbiologische Methoden

C.7.1 Isolierung von RNA aus Endothelzellen

Material:

- MPA
- L-NA
- PBS⁺
- Trizol-Reagenz
- Chloroform, H₂O gesättigt
- Isopropanol
- Ethanol 70%
- DEPC-H₂O

Konfluente, vorbehandelte HUVEC wurden zwei mal mit PBS⁺ gewaschen und mit 1ml Trizol-Reagenz versetzt. Um die Dissoziation von Nucleoproteinkomplexen zu vervollständigen, wurden die in Reaktionsgefäße überführten Zellysate noch 10 Minuten bei Raumtemperatur gehalten. Anschliessend erfolgte eine Zugabe von je 300µl Chloroform auf Eis und eine Zentrifugation der durchmischten Proben für 20 Minuten bei 14000x g bei 4°C.

Die obere, die RNA enthaltende Phase wurde abgenommen und eine Fällung mit Isopropanol durchgeführt. Nach nochmaliger 20-minütiger Zentrifugation bei 4°C mit 14000xg wurde der Überstand dekantiert, mit 1ml Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert (14000xg, 4°C). Das nun erhaltene Pellet wurde getrocknet und in 20µl DEPC-H₂O aufgenommen.

C.7.2 Bestimmung von Menge und Reinheit der RNA

Die RNA- Menge wurde durch Messung der Absorption bei 260nm und anschließender Berechnung nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{RNA: } (\mu\text{g/ml}) = A_{260\text{nm}} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Um die Reinheit der Nukleinsäuren zu bestimmen wurde zusätzlich die Absorption bei 280nm bestimmt und das Verhältnis $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ errechnet. Das Ergebnis lag mit unserem Protokoll stets zwischen 1.8 und 2.0, und sprach somit für eine ausreichende Reinheit der erhaltenen RNA.

C.7.3 Agarose Gel- Elektrophorese der RNA

Material:

- Agarose Gel: 1.5% agarose in TAE-Puffer, 0.5µg/ml Ethidium-Bromid
- 6facher Proben-Puffer

Die Proben wurden mit dem Probenpuffer auf das 1.5%ige Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese fand in TAE- Puffer bei 60mA für ca. 45 Minuten statt. Die Nukleinsäure- Fragmente wurden mit Hilfe von UV- Licht durch die Fluoreszenz des Ethidium- Bromids sichtbar gemacht.

C.7.4. RT-PCR

Material:

- dNTP, Endkonzentration: 0.2mM von jedem Desoxyribonukleotid (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- DTT-Lösung, Endkonzentration: 5mM
- GAPDH Primer, Endkonzentration: 0,4µM "upstream primer"; 0,4µM "downstream primer"(Tab. B)
- p22^{phox} Primer; Endkonzentration: 0,4µM "upstream primer"; 0,4µM "downstream primer"(Tab. B)
- Template RNA 1µg
- 5x rT-PCR-Puffer mit 1,5mM MgCl₂ (Endkonzentration)
- Enzym- Mix

Die Expression der NAD(P)H- Oxidase Untereinheit p22^{phox} wurde durch eine semiquantitative reverse Transkriptase- Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) bestimmt. Als Kontrolle wurde die Expression der Glycerinaldehyd 3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bestimmt. Ein Reaktionsansatz enthielt ein Volumen von 25µl; darin enthalten waren:

- 1.5µl dNTPs
- 3.75µl DTT
- 1µl Primer (sense und antisense)
- 0.5µl Enzymmix
- 5µl rT-Puffer
- 1µg (=zwischen 0.5 und 3µl) Template RNA
- bidest H₂O ad 25µl

Die RNA wurde mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschliessend bei 94°C denaturiert. Nach dem Abkühlen der erhaltenen cDNA-Bruchstücke auf 66°C wurden die betroffenen Abschnitte durch die TaqDNA Polymerase amplifiziert (genaue Zyklen-und Temperaturangaben in der Tab. C).

	Primer Paare	Länge des PCR Produkts	Annealing Temperatur
GAPDH	5'-TCC AAA ATC AAG TGG GGC GAT GCT-3' 5'-ACC ACC TGG TGC TCA GTG TAG CCC-3'	598bp	66°C
p22^{phox}	5'-GTT TGT GTG CCT GCT GGA GT- 3' 5'-TGG GCG GCT GCT TGA TGG T- 3'	306bp	66°C

Tab. B
Primer-Sequenzen GAPDH und p22^{phox}

		10 Zyklen			25 Zyklen				
50°C	94°C	94°C	66°C	68°C	94°C	66°C	68°C	68°C	4°C
30.0	4.0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	7.0 min	∞

Tab. C
Verwendete PCR- Zyklen.

Das erhaltene PCR- Produkt wurde auf einem Standard-Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidium Bromid markiert und durch UV- Licht sichtbar gemacht. Die Bandenintensität wurde densitometrisch ausgewertet (Software: Molekular Analyst).

C.8 Proteinchemische Methoden

C.8.1 Isolierung des rekombinanten PAK-PBD

- pGEX Vector
- Ampicillin
- IPTG
- NETN-Puffer
- Glutathion-S-Sepharose 4b Beads

Die p21-bindende Domäne (PBD) von PAK1 wurde in E.coli mit Hilfe des pGEX Vektors exprimiert, wie vorbeschrieben (Bassermann 2002, Bokoch 2002). Dazu wurde das Bakterienwachstum (optische Dichte von 600nm, in 0,7 Luria-Bertani Medium, mit 100µg Ampicillin/mL) durch Zugabe von 0.1mM IPTG bei 37°C induziert und für weitere 2 Stunden kultiviert. Die Bakterien wurden dann zentrifugiert und in NETN-Puffer resuspendiert und sonifiziert. Anschliessend wurden 30µl der Glutathion-Sepharose-4b-Beads zum gereinigten Zellysat gegeben, 30 Minuten bei 4°C inkubiert und 3mal mit NETN-Puffer gewaschen.

C.8.1 Proteinisolierung aus HUVEC für die Membranfraktionierung

Material:

- MPA
- PMA
- PBS⁻
- Lysispuffer

Nach entsprechender Vorbereitung wurden die Endothelzellen von der Zellkulturschale mit Lysispuffer abgelöst. Nach Zentrifugation (2000rpm, 4 Minuten, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und wiederum zentrifugiert (35 Minuten, 15000rpm), um die zytosolische von der partikulären Fraktion zu trennen. Der zytosolische Anteil wurde verworfen, das Pellet einmal mit Lysispuffer gewaschen und wieder zentrifugiert (5 Minuten, 15000rpm, 4°C).

Das Pellet wurde nun in Lysispuffer aufgenommen, 10 Minuten bei 100°C denaturiert, für 30 Minuten im Ultraschallbad gehalten und gründlich gevortext, um die vollständige Auflösung des Pellets zu gewährleisten.

C.8.2 Proteinisolierung für den Rac1- GTPase Assay

- MPA
- PBS
- Lysispuffer
- GST-PAK Beads (30µl)

Nach 24- stündiger Vorinkubation von HUVEC mit MPA (10µM) wurden die Zellen auf Eis mit PBS gewaschen, in Lysispuffer aufgenommen und in flüssigem Stickstoff gefroren. Nach dem Auftauen folgte eine 30- minütige Inkubation der Lysate bei 4°C mit 30µg der rekombinanten GST-PAK-Beads. Nach mehreren Waschschritten mit Lysispuffer wurde das Pellet in SDS- Probenpuffer gelöst und wie in den folgenden Punkten beschrieben durch Western blotting mit einem monoklonalen anti- Rac1- Antikörper analysiert. Zusätzlich wurde die Menge des Gesamtzelllysates als Ladekontrolle untersucht.

C.8.3 Proteinmengenbestimmung (BCA-Methode)

Material:

- BCA-Lösungen A und B
- Proteinstandard (2mg/ml BSA)

In jedes Well einer 96- Well Platte wurden 200µl der BCA- Lösung (Verhältnis 50:1) und 10µl Zellysat hinzugegeben und die Extinktion bei 595nm bestimmt. Parallel dazu wurde zur Ermittlung des Proteingehalts der Proben mit einem Proteinstandard eine Eichreihe mit 1-15µg/200µl erstellt.

C.8.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Material:

- Acrylamid Lösung
- 4 x Trenngelpuffer
- 4 x Sammelgelpuffer
- 2 x Probenpuffer
- SDS
- APS
- TEMED
- Elektrophorese-Laufpuffer

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 12%igem Polyacrylamid- Trenngel unter denaturierenden Bedingungen.

Hierfür wurden die Acrylamidlösung, H₂O und Trenngelpuffer gut gemischt und ca. 20 Minuten entgast. Danach wurden SDS, APS und TEMED hinzugefügt und erneut

vermischt. Die Lösung wurde durch zwei durch 1mm dicke Spacer getrennte Glasplatten gegeben und mit H₂O-gesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach 30 Minuten war das Gel polymerisiert und der Alkohol wurde durch gründliches Waschen entfernt. Das 4% ige Sammelgel (3ml H₂O, 1.25ml Tris pH 6.8, 0.05ml SDS, 0.65ml Acrylamid, 0.025ml APS und 0.005ml TEMED), welches unter gleichen Bedingungen wie das Trenngel hergestellt wurde, wurde auf das Trenngel gegossen und wiederum 30 Minuten polymerisiert.

Die Proteinproben wurden mit reduzierendem Probenpuffer (Verhältnis 1:1) vermischt, durch 10- minütiges Kochen bei 100°C denaturiert, und anschliessend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese selbst zur Auftrennung der Zellproteine fand bei einer Stromstärke von circa 47mA für circa drei Stunden statt.

C.8.5 Western-Blotting (anti-Rac1)

Material:

- Transferpuffer
- Methanol

Die aufgetrennten, unfixierten Proteine wurden nun elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde die PVDF- Membran kurz mit 100% Methanol befeuchtet, 5 Minuten in Aqua dest. gegeben und anschliessend in Transferpuffer mit 20% Methanol weiter äquilibriert (10 Minuten).

Zwei in Transferpuffer getränkte Lagen Filterpapier wurden glatt und luftblasenfrei auf eine Graphitanode gelegt, darauf die Membran, das Polyacrylamidgel und zwei weitere Lagen Filterpapier. Nach Auflegen der Graphitkathode wurden bei einer Stromstärke von 350mA die Proteine auf die Membran transferiert.

C.9 Immunoprint

- PBS⁻
- Blocking Puffer
- Waschpuffer
- SuperSignal
- Erst- Antikörper: Anti-Rac 1 (Maus) IgG
- Zweit-Antikörper: Anti-IgG-Maus

Nach dem Proteintransfer auf die PVDF-Membran erfolgte eine 2-stündige Inkubation mit Blocking-Puffer (Raumtemperatur, unter Schütteln), um die unspezifischen Bindungen der Antikörper an die Membran herabzusetzen. Danach wurde die Membran 3 mal 15 Minuten in Waschpuffer gewaschen und anschliessend über Nacht (4°C) mit dem Rac1 spezifischen Antikörper inkubiert. Nach 3 Waschgängen wurde die Membran für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem Zweit-Antikörper inkubiert. Anschliessend folgten nochmal 3 Waschschrte à 15 Minuten. Die vom Erst- Antikörper gebundenen Proteine konnten nun indirekt über den gebundenen Zweit-Antikörper mittels der Peroxidasereaktion nachgewiesen werden. Dafür wurde auf die Membran 1ml der Super-Signal-Lösung gegeben und dann die Chemilumineszenzintensität durch Belichtung des Röntgenfilms für circa 1 Minute registriert. Die Auswertung der Intensität der Proteinbanden auf dem Röntgenfilm erfolgten densitometrisch (Software: Molekular Analyst)

C.10 Statistische Analysen

Die präsentierten Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Der Standardfehler des Mittelwertes errechnet sich aus der Standardabweichung nach Division von der Wurzel aus n.

Zum Vergleich der Gruppen mit und ohne Behandlung wurde der Wilcoxon *Signed rank test* für gepaarte Beobachtungen verwendet.

Unterschiede wurden als signifikant gewertet, wenn die Fehlerwahrscheinlichkeit unter $p < 0.05$ lag.

D Ergebnisse

D.1 Effekte der Immunsuppressiva auf die endotheliale Superoxidanionen-Produktion

Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen der immunsuppressiven Therapie nach Herztransplantation und endothelialer Dysfunktion durch eine vermehrte $O_2^{\cdot-}$ - Bildung im Endothel herzustellen.

Dazu wurde zuerst untersucht, ob die verschiedenen Immunsuppressiva (CsA, FK506, Everolimus und MPA) eine Veränderung der $O_2^{\cdot-}$ - Produktion bewirken und, wenn ja, ob diese Veränderung über eine NAD(P)H- abhängige Oxidase vermittelt wird.

D.1.1 Die Calcineurininhibitoren Cyclosporin A und FK 506

D.1.1.1 Beeinflussung der Superoxidanionen- Produktion

Zunächst wurde untersucht, inwiefern die Calcineurininhibitoren CsA und FK 506 die endotheliale $O_2^{\cdot-}$ - Produktion beeinflussen.

Im Cytochrom C- Assay zeigte sich nach 6 und 24-stündiger Inkubation mit CsA (100nM bzw. 1µM) eine signifikante Erhöhung der $O_2^{\cdot-}$ - Produktion ($p<0.01$, $n=15-21$) (Tab. 1). Mittels einer zweiten Methode, der DCF- Fluoreszenz, konnte diese Erhöhung der $O_2^{\cdot-}$ - Produktion bestätigt werden ($p<0.01$, $n=10-12$) (Tab. 2).

Eine 6- bzw. 24- stündige Inkubation mit FK 506 (100nM bzw. 1µM) führte bei der Messung mittels DCF- Fluoreszenz ebenfalls zu einer signifikanten Steigerung der $O_2^{\cdot-}$ - Bildung ($p< 0.01$ bzw. $p<0.05$, $n=7-13$) (Tab. 2). Im Cytochrom C- Assay konnten diese Daten statistisch nur für die 24- stündige Messung bestätigt werden ($p<0.01$, $n=21-24$). Die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Calcineurininhibitoren auf die $O_2^{\cdot-}$ - Bildung sind in Tab.1 und 2 zusammengefasst. Bei einer kurzfristigen Behandlung mit den Calcineurininhibitoren war keine Steigerung der $O_2^{\cdot-}$ - Produktion nachweisbar (ns, $n=21$). Eine 48- stündige Inkubation zeigte keine weiteren Effekte gegenüber einer 24- stündigen Inkubation (Daten nicht gezeigt). Die stärkste Wirkung war sowohl bei CsA als auch bei FK506 bei einer Konzentration von 100nM zu beobachten.

	Kontrolle	100nM	1µM
CsA, 6h (n=21)	100	150 ± 15**	129 ± 14
CsA, 24h (n=15)	100	265 ± 55**	197 ± 35
FK506, 6h (n=24)	100	212 ± 109	137 ± 44
FK506, 24h (n=21)	100	157 ± 16**	146 ± 20

Tab. 1 Effekte der Calcineurininhibitoren auf die $O_2^{\cdot-}$ - Produktion (Cytochrom C- Assay). Nach 6- bzw. 24- stündiger Inkubation von HUVEC mit CsA bzw. FK 506 wurde eine signifikante Steigerung der $O_2^{\cdot-}$ - Bildung mit dem Cytochrom C- Assay beobachtet. Bei einer Konzentration von 100nM wurde jeweils die stärkste Reaktion hervorgerufen (% der Kontrolle ± S.E.M, ** p<0.01 vs. Kontrolle).

	Kontrolle	100nM	1µM
CsA, akut (n=21)	100	108± 5	92± 4
CsA, 6h (n=10)	100	140 ± 11**	137 ± 9**
CsA, 24h (n=12)	100	151 ± 30 **	147 ± 33
FK506, akut (n=21)	100	108 ± 7	109 ± 11
FK506, 6h (n=13)	100	134 ± 8**	130 ± 8**
FK506, 24h (n=7)	100	131 ± 8*	119 ± 6*

Tab. 2 Effekte der Calcineurininhibitoren auf die ROS- Produktion (DCF- Fluoreszenz). Inkubation von HUVEC mit CsA bzw. FK 506 erhöhte die ROS- Bildung nach 6 bzw. 24h mit der DCF- Fluoreszenz. Am deutlichsten waren die Veränderungen der ROS- Produktion bei einer Konzentration von 100nM. Bei den Akut- Messungen wurden keine signifikanten Änderungen der ROS- Bildung beobachtet (% der Kontrolle-Mittelwert ± S.E.M, *p< 0.05, ** p< 0.01 vs. Kontrolle).

D.1.1.2 Einfluss auf die NAD(P)H- Oxidase

Die Rolle der NAD(P)H- Oxidase bei der CsA/FK 506- induzierten $O_2^{\cdot-}$ - Produktion im Endothel wurde durch Zugabe von Inhibitoren der NAD(P)H- Oxidase untersucht. Ziel war es, zu überprüfen, ob die CsA/FK 506- induzierte Steigerung der $O_2^{\cdot-}$ - Produktion durch diese Hemmstoffe vermindert werden kann. Der unspezifische Flavoprotein- Inhibitor Diphenyleniodoniumchlorid (DPI, 30 μ M) reduzierte die CsA (100nM)- bzw. FK506 (100nM)- vermittelte $O_2^{\cdot-}$ - Produktion signifikant ($p < 0.01$; $n=8$) (Abb. 1). Der spezifische NAD(P)H- Oxidase- Hemmer gp91ds-*tat* (100 μ M) führte ebenfalls zu einer signifikanten Hemmung der Calcineurininhibitor- induzierten $O_2^{\cdot-}$ - Produktion ($p < 0.05$, $n=8$) (Abb. 1).

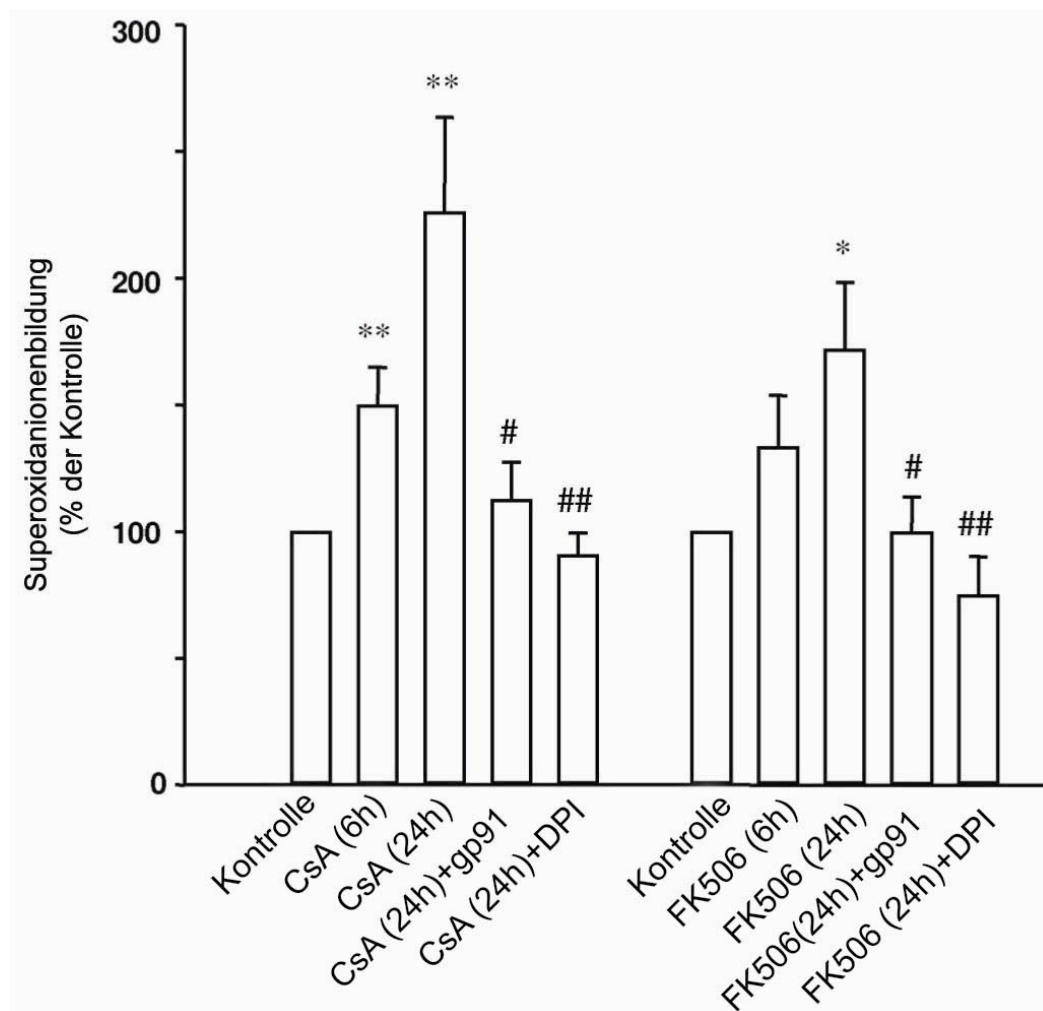


Abb. 1 Effekte der NAD(P)H- Oxidase Inhibitoren auf die Calcineurininhibitoren induzierte $O_2^{\cdot-}$ - Bildung. CsA und FK506 (jeweils 100nM) erhöhten die endotheliale $O_2^{\cdot-}$ - Bildung im Cytochrom C- Assay nach 6 bzw. 24 Stunden deutlich. DPI (30 μ M) und gp91ds-*tat* (100 μ M) hemmten die durch die Calcineurininhibitoren induzierte $O_2^{\cdot-}$ - Bildung (% der Kontrolle-Mittelwert \pm S.E.M ; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ vs. Kontrolle, # $p < 0.05$ ## $p < 0.01$ vs. CsA/ FK506; $n=8$).

Weiterhin wurde in Lysaten von HUVEC, die vorher für 6 bzw. 24 Stunden mit CsA/FK506 (100nM) inkubiert worden waren, die Aktivität einer NAD(P)H-abhängigen Oxidase direkt bestimmt. Die NAD(P)H- Oxidase Aktivität der mit CsA für 6 Stunden vorinkubierten HUVEC war ca. 3.7- fach erhöht ($p < 0.01$, $n=17$) (Abb. 2). Nach längerer Inkubation (24 Stunden) war dieser Effekt auf die Enzymaktivität nicht mehr nachweisbar (ns, $n=24$, Daten nicht gezeigt).

Bei FK506 war die Aktivität der NAD(P)H- Oxidase nach 6- stündiger Vorinkubation ebenfalls signifikant gesteigert ($p < 0.05$, $n=17$) (Abb. 2); zusätzlich zeigte sich bei FK506 auch eine Erhöhung der NAD(P)H- Oxidase Aktivität nach 24- stündiger Vorinkubation ($p < 0.05$, $n=24$, Daten nicht gezeigt).

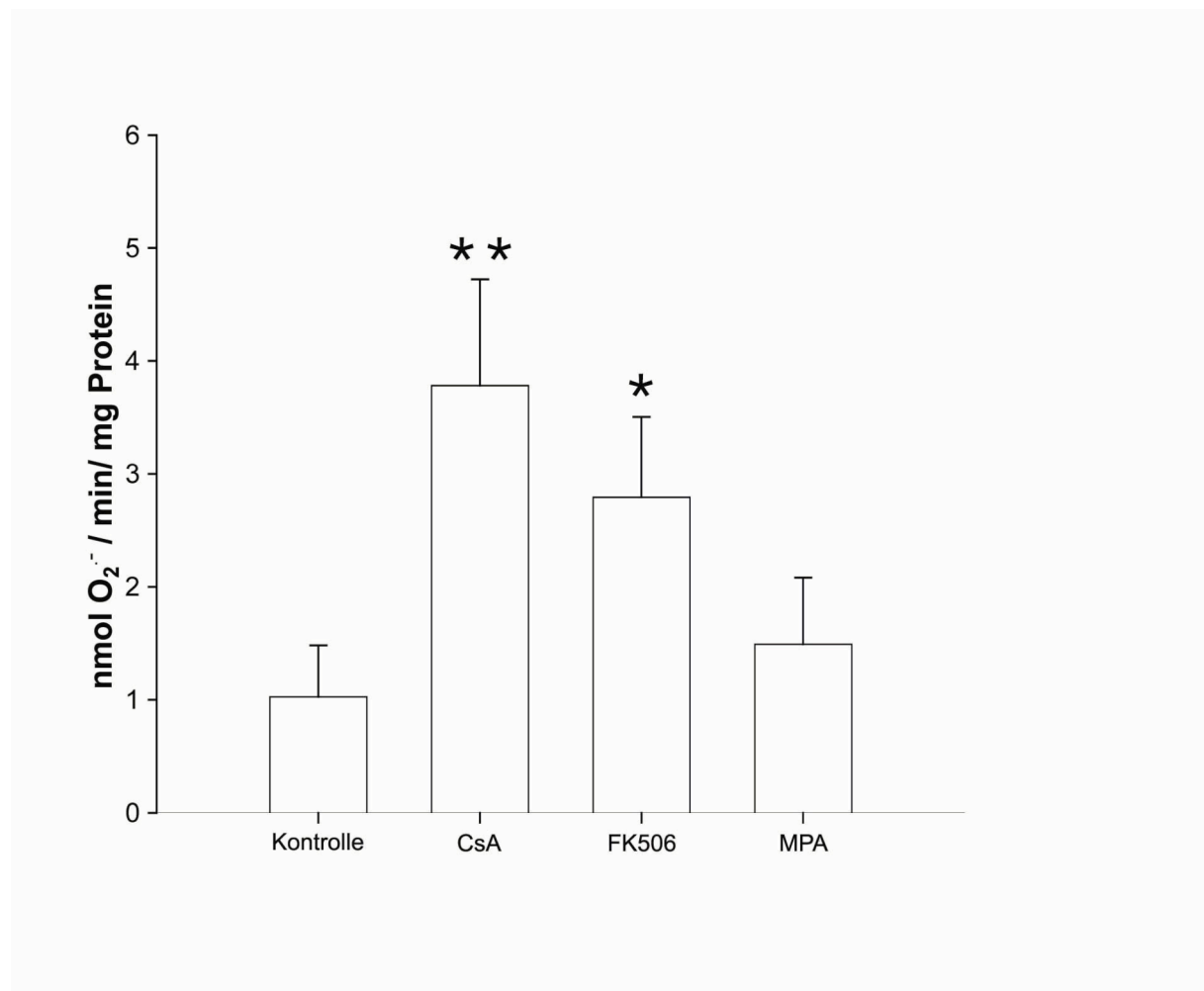


Abb. 2 Effekte der Immunsuppressiva auf die NAD(P)H- Oxidase Aktivität. CsA und FK 506 (jeweils 100nM) erhöhten die NAD(P)H- Oxidase Aktivität nach 6-stündiger Vorinkubation in HUVEC- Zellysaten. MPA (1µM) zeigte keine Effekte auf die NAD(P)H- Oxidase Aktivität (nmol O₂⁻ /min/mg Protein ± S.E.M; ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $n=17$).

D.1.2 Einfluss des mTOR Inhibitors Everolimus auf die Superoxidanionen-Produktion

Everolimus hatte insgesamt keine einheitlichen Effekte auf die endotheliale $O_2^{\cdot-}$ -Produktion. Weder nach 6-stündiger noch nach 24- stündiger Inkubation war im Cytochrom C- Assay eine Veränderung nachweisbar (ns, n=28-30) (Tab. 3).

In der DCF- Fluoreszenz war nach 24 Stunden bei 10nM eine Erhöhung ($p < 0.01$, n=23), bei 100nM und 1 μ M eher eine Reduktion der ROS- Produktion zu beobachten ($p < 0.01$, n=23) (Tab. 4).

	Kontrolle	10nM	100nM	1 μ M
Everolimus, 6h (n=28)	100	123 \pm 17	109 \pm 8	116 \pm 16
Everolimus, 24h (n=30)	100	99 \pm 2	101 \pm 11	111 \pm 6

Tab. 3 Effekt von Everolimus auf die $O_2^{\cdot-}$ - Produktion (Cytochrom C-Assay). Eine Inkubation mit HUVEC für 6 bzw. 24 Stunden mit Everolimus zeigte keine Veränderung der $O_2^{\cdot-}$ - Produktion im Cytochrom C- Assay (% der Kontrolle \pm S.E.M, ns).

	Kontrolle	10nM	100nM	1 μ M
Everolimus, 6h (n=24)	100	k.D.	89 \pm 17	129 \pm 21
Everolimus, 24h (n=23)	100	120 \pm 6**	78 \pm 5**	73 \pm 5**

Tab. 4 Effekt von Everolimus auf die ROS – Produktion (DCF- Fluoreszenz). Nach 6- stündiger Inkubation mit Everolimus zeigte sich in der DCF- Fluoreszenz keine signifikante Veränderung der ROS- Produktion in HUVEC. Nach 24 Stunden kam es bei 10nM eher zu einem Anstieg der ROS- Bildung, bei 100nM und 1 μ M eher zu einer verminderten ROS- Produktion (% der Kontrolle- Mittelwert \pm S.E.M, ** $p < 0.01$ vs.Kontrolle).

D.1.3 Der Antimetabolit Mycophenolsäure

D.1.3.1 Beeinflussung der Superoxidanionen- Produktion

Eine langfristige Inkubation mit MPA führte zu einer signifikanten und konzentrationsabhängigen Erniedrigung der endothelialen $O_2^{\cdot-}$ - Produktion (Tab. 5 und 6). Mit dem Cytochrom C- Assay wurde nach 6- stündiger Vorinkubation mit MPA die stärkste Wirkung erzielt ($p < 0.01$, $n=17$). Nach 48- stündiger Vorinkubation war keine Wirkung von MPA mehr nachzuweisen (ns, $n=8$). Die Erniedrigung der ROS- Bildung, gemessen mit der DCF- Fluoreszenz, war nach 6-, 24- und nach 48- stündiger Vorinkubation mit MPA signifikant erniedrigt ($p < 0.01$, $n=8-13$). Ein unmittelbarer Effekt von MPA auf die $O_2^{\cdot-}$ - Bildung konnte bei beiden Methoden nicht festgestellt werden (ns, $n=14-15$).

	Kontrolle	1 μ M	10 μ M
MPA, akut (n=14)	100	80 \pm 17	95 \pm 16
MPA, 6h (n=17)	100	60 \pm 6**	51 \pm 11**
MPA, 24h (n=17)	100	80 \pm 9**	62 \pm 11**
MPA, 48h (n=8)	100	85 \pm 15	89 \pm 14

Tab. 5 Effekt von MPA auf die $O_2^{\cdot-}$ - Produktion (Cytochrom C- Assay). Nach längerfristiger (6 bzw. 24 Stunden) Inkubation von HUVEC kam es zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung der $O_2^{\cdot-}$ - Produktion im Cytochrom C- Assay. In der Akutmessung sowie nach 48- stündiger Vorinkubation zeigte sich keine signifikante Veränderung der $O_2^{\cdot-}$ - Bildung (% der Kontrolle \pm S.E.M, ** $p < 0.01$ vs. Kontrolle).

	Kontrolle	1 μ M	10 μ M
MPA, akut (n=15)	100	102 \pm 10	87 \pm 9
MPA, 6h (n=12)	100	74 \pm 2 **	67 \pm 5 **
MPA, 24h (n=8)	100	71 \pm 3 **	67 \pm 6 **
MPA, 48h (n=13)	100	81 \pm 6**	60 \pm 7**

Tab. 6 Effekt von MPA auf die ROS- Produktion (DCF-Fluoreszenz). Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Erniedrigung der ROS- Produktion durch MPA (6, 24, 48 Stunden Vorinkubation) in der DCF- Fluoreszenz. Akut zeigte sich auch bei der DCF-Fluoreszenz keine Veränderung der ROS- Produktion (% der Kontrolle \pm S.E.M, ** $p < 0.01$ vs. Kontrolle).

D.1.3.2 Einfluss von Mycophenolsäure auf die NAD(P)H- Oxidase

Indirekte Hinweise auf die Beteiligung der NAD(P)H- Oxidase an der Reduktion der $O_2^{\cdot-}$ - Bildung durch MPA ergaben parallele Inkubationsversuche mit NAD(P)H- Oxidase Inhibitoren: Während DPI (30 μ M) und gp91ds-*tat* (100 μ M) die basale Superoxidanionen- Produktion (ohne MPA) um $19.8 \pm 7\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) bzw. $23.0 \pm 6\%$ ($p < 0.01$, $n=16$) erniedrigten, war nach Vorinkubation mit MPA (10 μ M) keine zusätzliche Reduktion der $O_2^{\cdot-}$ - Produktion mehr nachzuweisen (MPA+DPI 94.9 ± 13 und MPA+ gp91ds-*tat* $83.2 \pm 9\%$ vs. MPA, ns, $n=8$). Im NAD(P)H- Oxidase- Aktivitätsassay zeigte sich allerdings, dass die Aktivität des Enzyms weder nach 6- noch nach 24- stündiger Vorinkubation mit MPA (ns, $n=17- 24$) signifikant beeinflusst wurde (Abb. 2).

D.1.3.2 Effekte von Mycophenolsäure auf die Proteinkinase C-vermittelte Superoxidanionen- Bildung

Es wurde untersucht, ob MPA nicht nur die basale, sondern auch die Agonisten- induzierte $O_2^{\cdot-}$ - Produktion in HUVEC reduzieren kann.

Hierzu wurde ein starker Stimulus der NAD(P)H- Oxidase, der Proteinkinase C (PKC)- Aktivator Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA, 1 μ M) verwendet.

Wie in Abb. 3 ersichtlich, kam es zu einer Steigerung der $O_2^{\cdot-}$ - Produktion durch PMA ($p < 0.01$, $n=8$), welcher signifikant durch MPA (10 μ M) gehemmt wurde ($p < 0.05$, $n=8$).

Die MPA- vermittelte Reduktion der $O_2^{\cdot-}$ - Bildung wurde durch Zugabe des NAD(P)H- Oxidase- Inhibitors DPI (30 μ M) deutlich reduziert ($p < 0.01$ vs. PMA + MPA; $n=8$), während gp91ds-*tat* (100 μ M) keine zusätzliche Reduktion der $O_2^{\cdot-}$ - Produktion in Anwesenheit von MPA induzierte (ns, $n=8$) (Abb. 3).

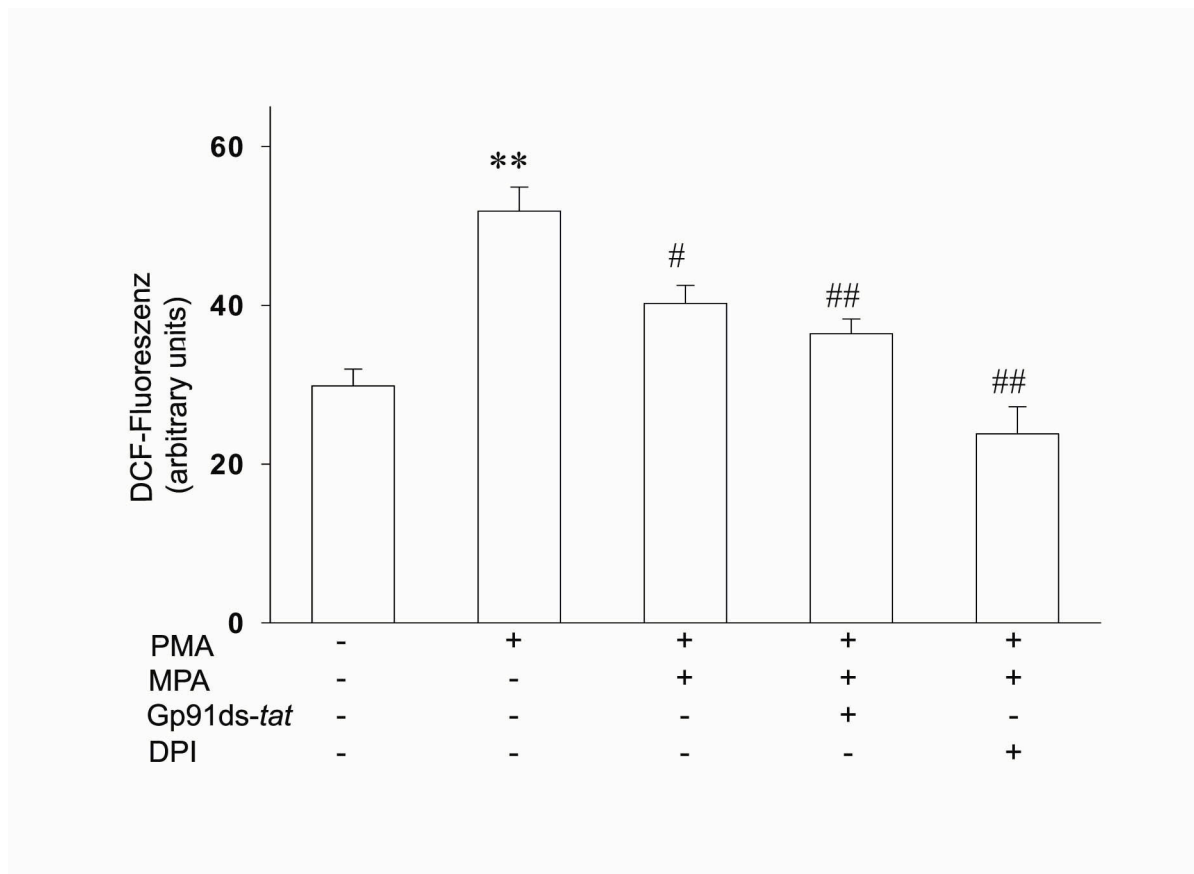


Abb. 3 Effekte von MPA auf die endotheliale $O_2^{\cdot-}$ -Produktion via NAD(P)H- Oxidase (DCF- Fluoreszenz). MPA (10 μ M) inhibierte die PMA- induzierte Bildung von ROS. Gp91ds-tat (100 μ M) hatte keinen zusätzlichen inhibitorischen Effekt in Anwesenheit von MPA. DPI verminderte (30 μ M) die ROS- Bildung zusätzlich (p<0.01 vs. PMA+MPA) (% der Kontrolle \pm S.E.M, **p<0.01 vs. Kontrolle, # p<0.05, ## p<0.01 vs. PMA, n=8).

D.1.3.4 Einfluss von Mycophenolsäure auf die NAD(P)H- Oxidase in polymorphkernigen Neutrophilen (PMN)

Um die Rolle von MPA auf die NAD(P)H- Oxidase weiter einzugrenzen, wurden PMN herangezogen, da die zelluläre Quelle der $O_2^{\cdot-}$ - Bildung bei PMN maßgeblich die NADPH- Oxidase ist. Dafür wurden PMN nach 6-stündiger Vorinkubation mit MPA (10 μ M) zusätzlich mit PMA stimuliert, um die NADPH- Oxidase zu aktivieren.

Methodisch wurde die $O_2^{\cdot-}$ - Bildung in der Leukozytensuspension mittels der L-012 Chemilumineszenz Methode bestimmt. Die Zugabe von PMA (1 μ M) führte zu einer raschen und deutlichen Erhöhung des L-012 Chemilumineszenz-Signals (p<0.01, n=12) (Abb.4). Superoxid-Dismutase (SOD, 500 U/ml) hemmte die PMA- induzierte Stimulierung nahezu vollständig (p<0.05, n=12). PMN, die bereits mit MPA vorinkubiert waren, zeigten eine deutliche Abschwächung des Signals (p<0.05 vs PMA, n=12). Hingegen verminderte eine akute Zugabe von MPA die $O_2^{\cdot-}$ - Bildung nicht (Daten nicht gezeigt).

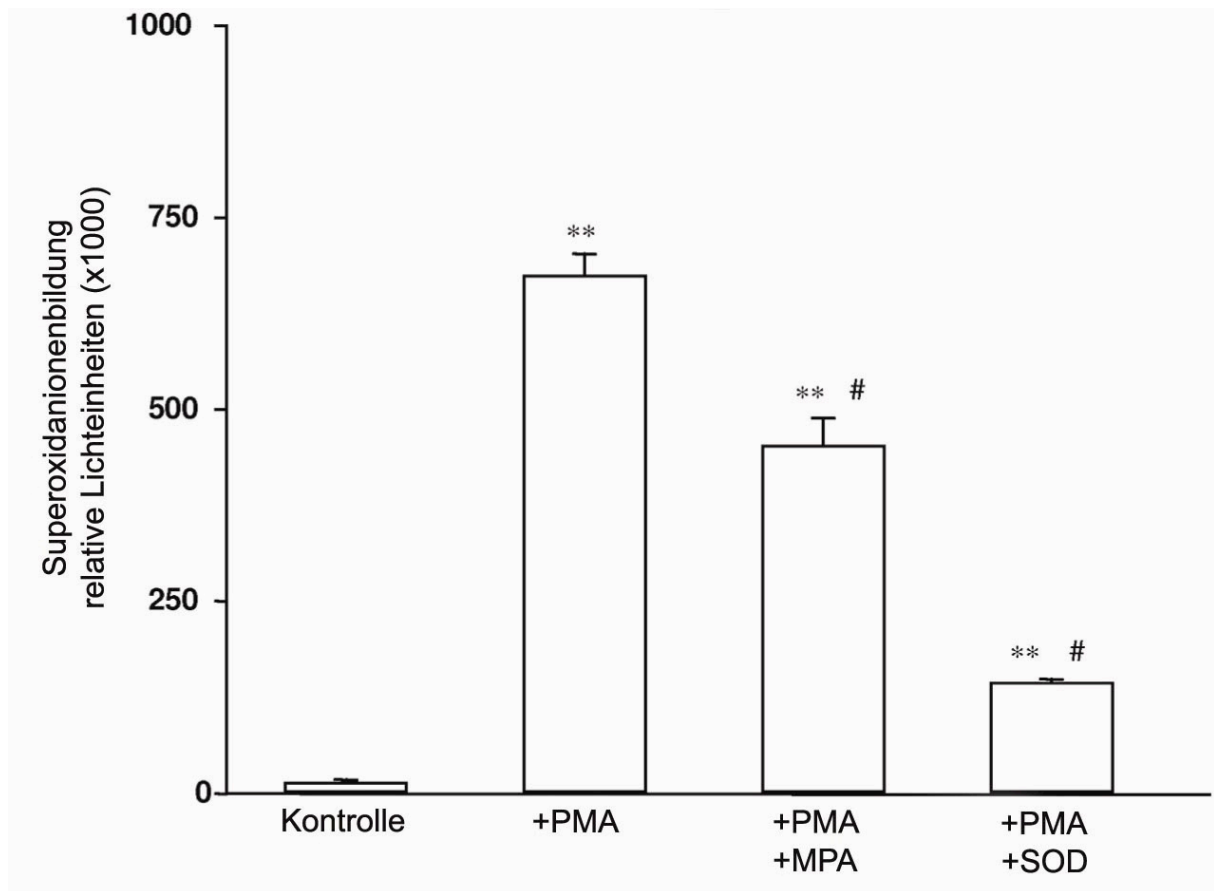


Abb. 4 Effekt von MPA auf die neutrophile NAD(P)H- Oxidase. Das L-012 Signal wurde nach Aktivierung der PMN durch den PKC- Aktivator PMA (1 μ M) deutlich erhöht. Diese Erhöhung wurde durch eine 6-stündige Inkubation mit MPA (10 μ M) vermindert. SOD (500U/ml) inhibierte die PMA- induzierte Stimulierung nahezu vollständig. (RLU/s- Mittelwert \pm S.E.M, **p<0.01 vs. Kontrolle, #p<0.05 vs. PMA, n=12).

D.1.4 Einfluss der Immunsuppressiva auf die Zellproliferation/vitalität

Damit ausgeschlossen werden konnte, dass die Veränderungen der $O_2^{\cdot-}$ - Produktion nicht durch eine Veränderung der Zellproliferation oder Zellvitalität in endothelialen Zellen bedingt waren, wurden der MTT- Assay zur Messung der Zellproliferation, und der Trypanblau- Assay, zur Messung der Zellvitalität, durchgeführt.

Nur Everolimus zeigte im MTT- Assay eine Reduktion der Zellproliferation an konfluenten Zellen. Alle weiteren Immunsuppressiva hatten keinen signifikanten Einfluss auf Zellwachstum- und Zellvitalität (Daten nicht gezeigt).

D.2 Zelluläre Mechanismen der Mycophenolsäure- vermittelten Hemmung der ROS-Produktion

D.2.1 Expression der NAD(P)H- Oxidase Untereinheit p22^{phox}

Die bisher durchgeführten Versuche liessen vermuten, dass die NAD(P)H- Oxidase bei der MPA- vermittelten O₂⁻- Hemmung involviert ist. Deshalb sollte nun mittels RT-PCR überprüft werden, ob die transkriptionelle Expression der membranständigen Untereinheit p22^{phox} (24-stündige Vorinkubation mit MPA (10µM)) in HUVEC verändert wird. Es zeigte sich in einer semiquantitativen RT-PCR kein signifikanter Unterschied der p22^{phox} mRNA- Expression nach MPA-Inkubation im Vergleich zur Kontrollgruppe (ns, n=5) (Abb. 5).

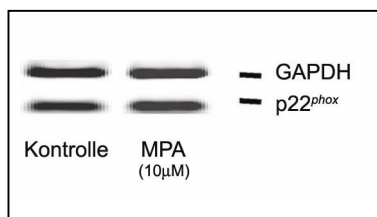


Abb. 5 Einfluss von MPA auf die Expression der NAD(P)H- Oxidase Untereinheit p22^{phox}. Die p22^{phox} mRNA-Expression wurde durch eine Inkubation mit MPA (10µM) für 24 Stunden nicht beeinflusst (semiquantitative RT-PCR) (Mittelwert ± S.E.M; ns, n=5).

D.2.2 Wirkung von Mycophenolsäure auf Rac1 und die Rolle von Guanosin

D.2.2.1 Effekt von Mycophenolsäure auf membrangebundenes Rac1

Um die Mechanismen der MPA- vermittelten Hemmung der endothelialen NAD(P)H- Oxidase zu untersuchen, wurde überprüft, ob MPA die Aktivierung der GTPase Rac1 moduliert. Rac1 ist für eine vollständige Aktivierung der NADP(H)- Oxidase essentiell. Dafür wurde nach Vorinkubation mit MPA (10 μ M) die Menge der membranständigen, aktiven Fraktion von Rac1 bestimmt. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion des membran-gebundenen Rac1 durch die 24- stündige Vorinkubation der HUVEC mit MPA ($p < 0.05$, $n=7$) (Abb. 6).

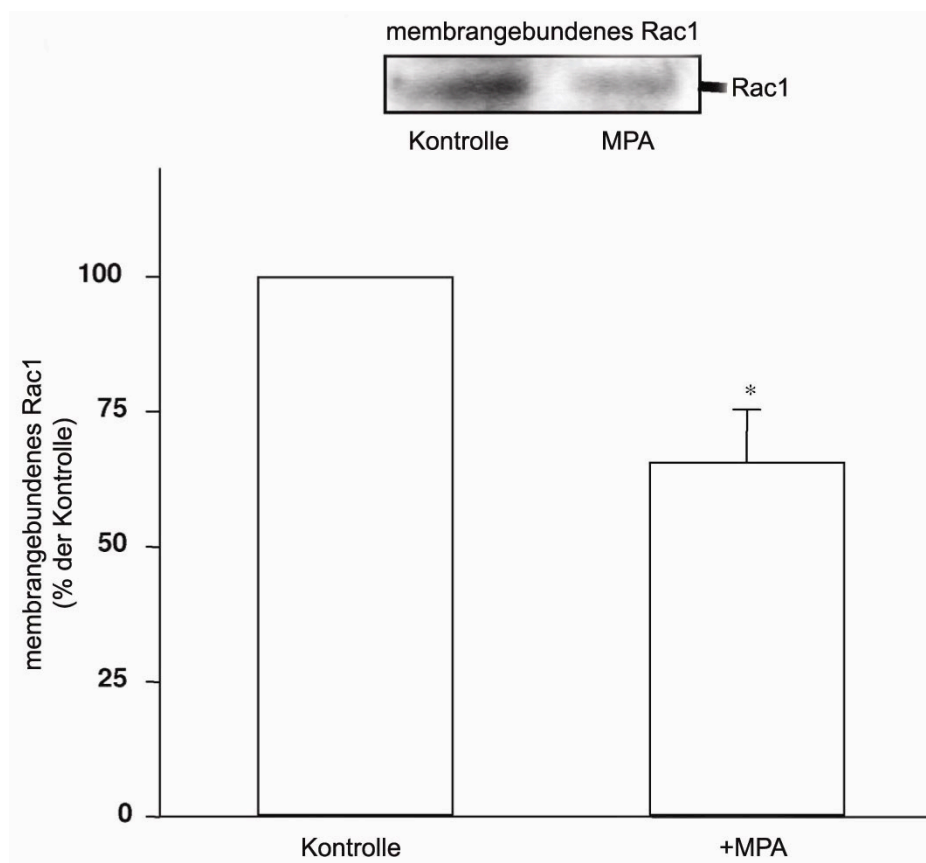


Abb. 6 Effekt von MPA auf die membranständige Rac1- Fraktion in HUVEC. In mit MPA (10 μ M) 24 Stunden vorinkubierten HUVEC zeigte sich im Western- Blot eine geringere Menge der membranständigen, aktiven Fraktion von Rac1 (% der Kontrolle- Mittelwert \pm S.E.M.; * $p < 0.05$ Kontrolle vs. MPA= 100% vs. 66 \pm 10, $n=7$).

D.2.2.2 Einfluss von Mycophenolsäure auf die Rac1- Aktivität

Zur Klärung der Frage, ob die Reduktion der Menge der membranständigen Fraktion von Rac1 auch mit einer verminderten Aktivität von Rac1 einhergeht, wurde ein spezifischer pull- down Assay durchgeführt, wodurch aktiviertes Rac1 nachgewiesen werden kann. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Membrantranslokation war nach 24- stündiger Vorinkubation mit MPA (10 μ M) die Rac1- Aktivität eher vermindert (n=4) (Abb. 7).

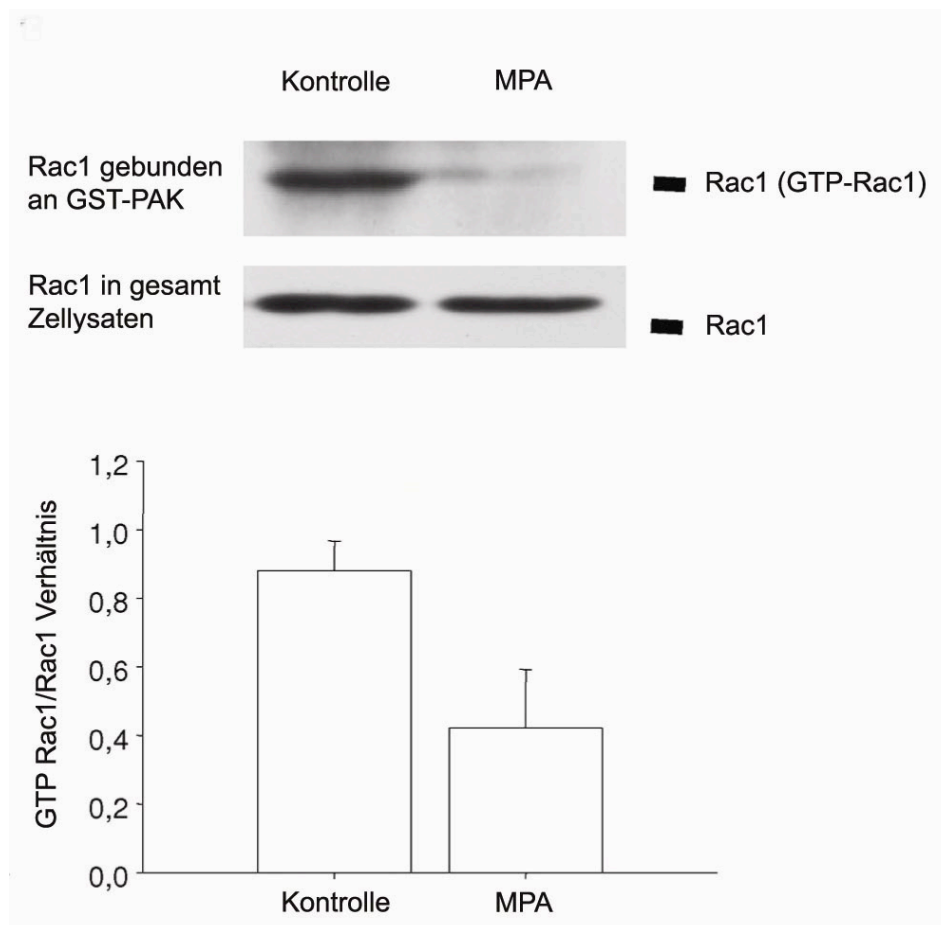


Abb. 7 Effekt von MPA auf die Menge des aktivierten (GTP-gebundenen) Rac1. Die mit MPA (10 μ M) 24 Stunden vorbehandelten HUVEC wiesen eine verminderte Aktivität der kleinen GTPase Rac1 im pull- down Assay auf. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot; oben das aktivierte Rac1 und unten das Gesamt Rac1- Gehalt der Zelle als Kontrolle (% der Kontrolle- Mittelwert \pm S.E.M).

D.2.2.3 Effekt von Guanosin auf die Mycophenolsäure- induzierte Hemmung von ROS

MPA induziert durch Hemmung der Inosin- Monophosphat- Dehydrogenase (IMPDH) eine Senkung des GTP- Spiegels. Da GTP für die Rac1- Aktivierung notwendig ist, wurde untersucht, ob die Hemmung der NAD(P)H- Oxidase durch MPA mit Gabe von Guanosin aufgehoben werden kann.

Es zeigte sich, dass im Falle einer parallelen Inkubation der HUVEC mit MPA (10 μ M) und Guanosin (1 μ M) die Hemmung der ROS- Produktion nicht mehr zu beobachten ist (Kontrolle vs. MPA+Guanosin = 100 vs. 94 \pm 12, ns, n=6) (Abb. 8). Eine kurzfristige Behandlung mit Guanosin zeigte hingegen keine Effekte auf die ROS- Bildung (Daten nicht gezeigt).

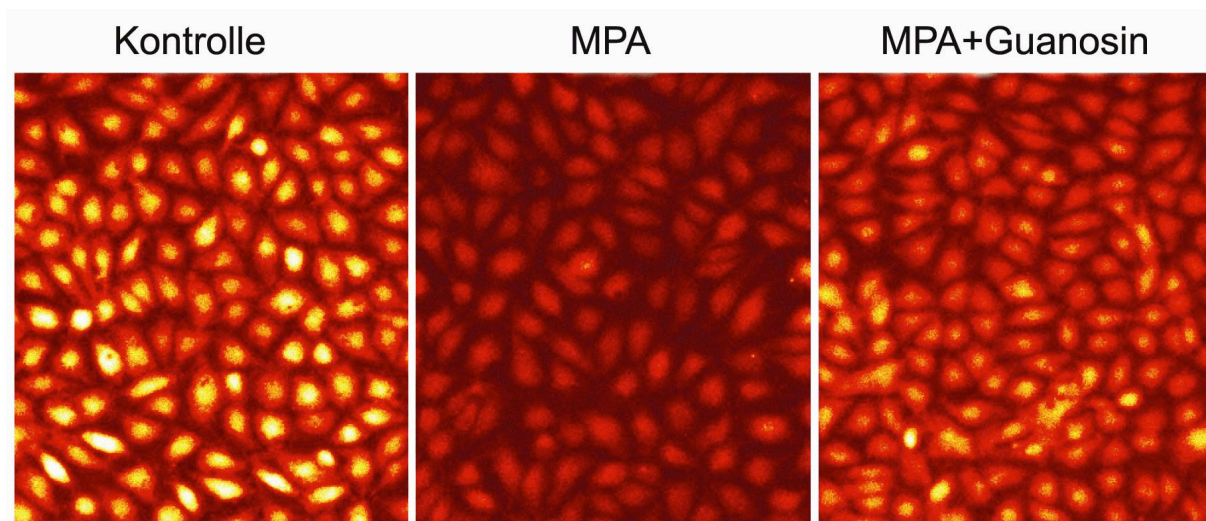


Abb. 8 Effekt von Guanosin auf die MPA- induzierte Hemmung der ROS- Produktion. Bei 24-stündiger Vorinkubation von HUVEC mit Guanosin (1 μ M) und MPA (10 μ M) war die MPA- induzierte Hemmung der ROS- Produktion in der DCF-Fluoreszenz nicht mehr zu beobachten (Kontrolle vs. MPA+Guanosin = 100 vs. 94 \pm 12, ns, n=6).

E Diskussion

Der Hauptbefund der vorliegenden Arbeit ist, dass Calcineurininhibitoren die $O_2^{\cdot-}$ -Produktion in endothelialen Zellen erhöhten, während MPA diese hemmte. Diese Daten würden bei herztransplantierten Patienten – unabhängig von der immunsuppressiven Potenz der Substanzen – eher ein Therapieregime mit MPA unterstützen, um möglicherweise das Auftreten bzw. das Fortschreiten der TVP durch eine Erhaltung der Endothelfunktion zu vermindern. Die Hauptquelle der vaskulären $O_2^{\cdot-}$ ist nach bisherigen Daten eine NAD(P)H- abhängige Oxidase. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass sowohl die Calcineurininhibitoren, als auch MPA ebenfalls die Aktivität der NAD(P)H- Oxidase modulieren.

E.1 Die NAD(P)H- Oxidase im Endothel

Die endotheliale NAD(P)H- Oxidase ist ein membran- gebundenes Enzym, das die Reduktion von Sauerstoff katalysiert und dabei intrazelluläres NADH oder NADPH als Elektronen- Donor benutzt (de Keulenaer 1998, Landmesser 2002). Die Oxidase ist ein Multikomponenten- Enzym, welches nach Aktivierung mindestens aus vier Untereinheiten zusammengesetzt wird: Die an die Membran gebundene Untereinheit Cytochrom b558, die wiederum aus einer größeren Untereinheit gp91^{phox} und einer kleineren, p22^{phox} besteht, und mindestens zwei zytosolischen Untereinheiten p47^{phox} und p67^{phox} (Babior 1999, Brandes 2005, Ray 2005).

In vaskulären Zellen wurden in jüngster Zeit mehrere Isoformen der NAD(P)H Oxidase nachgewiesen, die insgesamt als Nox Proteine (NAD(P)H- Oxidase) bezeichnet werden (Ray 2005). Von den Nox-Isoformen Nox 1-5 dominieren nach bisherigen Untersuchungen die Nox 2 und Nox 4 in Endothelzellen (Ambasta 2004, Cheng 2001). Da die Bedeutung der unterschiedlichen Nox-Isoformen jedoch noch weitgehend unklar ist, soll in der vorliegenden Arbeit weiterhin von einer NAD(P)H- Oxidase gesprochen werden.

Bisher wurde in zahlreichen Arbeiten gezeigt, dass in die Aktivierung der vaskulären NAD(P)H-Oxidase durch verschiedene (patho)physiologische Faktoren beeinflusst werden kann. Stimuli, die zur Erhöhung der NAD(P)H-Oxidase Aktivität führen, sind unter anderem Agonisten von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (z.B. Angiotensin II, Endothelin 1), Wachstumsfaktoren (Thrombin, vascular endothelial growth factor), Cytokine (z.B. TNF- α) und metabolische Veränderungen (wie z.B. Erhöhung der Glucose-, Insulin- oder ox-LDL-Konzentration). Zusätzlich können mechanische

Faktoren („shear stress“) oder Hypoxie/Reoxygenierung zur Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase führen (Brandes 2005, Gregg 2003, Li 2004, Ray 2005).

E.2 Rolle von Rac1 für die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase im Endothel

Ein Teil der NAD(P)H- Oxdasen im Endothel scheint unter „basalen“ Bedingungen konstitutiv aktiv zu sein, d.h. die einzelnen Untereinheiten sind bereits zusammengelagert (Brandes 2004, Li 2004, Somers 2000, Smith 2001). Dazu müssen zytosolische Untereinheiten des Enzyms an die Membran transloziert werden (Brandes 2004, Frey 2002, Meyer 1999). Ein wichtiger Regulator für die Aktivierung des Enzyms ist dabei die zytosolische GTPase Rac1. Es ist Mitglied der Rho- Familie von kleinen (20-40kDa) monomeren GTP- bindenden Proteinen, die alle durch die Bindung von GTP aktiviert werden und nach Hydrolyse zu GDP wieder in den inaktivierten Zustand versetzt werden. Das Binden von GTP wird durch Guanindissoziations- Inhibitoren (GDIs) verhindert und durch Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) verstärkt (Bokoch 1994, Gregg 2003). Durch die spezifischen Lipid- und Proteinbindenden Eigenschaften der GEFs wird entschieden, welcher weitere Weg in der Signalkaskade aktiviert wird. Auch ist die Affinität zur Oxidase abhängig von den beteiligten GEF (Gregg 2003, Alberts 2002). Nach bisherigen Vorstellungen wird nach Aktivierung von Rac1 ein Komplex mit der zytosolischen Untereinheit p67^{phox} der NAD(P)H- Oxidase gebildet (Brandes 2005). Dies führt zu deren Translokation an die Membran. Die Zusammenlagerung aller Untereinheiten führt zur vollen Aktivität der Oxidase (Li 2004). Rac1 selber besitzt eine GTPase Aktivität, die das Signal beendet und das System langsam wieder in den inaktiven Zustand versetzt. Diese langsam arbeitende Aktivität wird von Helferproteinen verstärkt, die man als GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) bezeichnet (Bokoch 1994, Gregg 2003, Lassegue 2003). Auch durch Phosphorylierung der Untereinheit p47^{phox} durch die Protein Kinase C (PKC) kann die Enzymaktivität durch Konformationsänderung des zytosolischen Komplexes reguliert werden (Gregg 2003). Obwohl die Oxidase innerhalb von Minuten aktiviert wird, kann auch nach Stunden noch eine Steigerung der Aktivierung durch eine vermehrte Expression von Untereinheiten erreicht werden (Zafari 1998, Seshiah 2002, Lassegue 2001).

E.3 Einfluss der Calcineurininhibitoren auf die endotheliale $O_2^{\cdot-}$ - Produktion und die NAD(P)H- Oxidase

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Calcineurininhibitoren die $O_2^{\cdot-}$ - Produktion über eine Erhöhung der NAD(P)H- Oxidase Aktivität steigern.

Es wurde bereits früher gezeigt, dass eine Therapie mit den Calcineurininhibitoren CsA und FK506 zu einer endothelialen Dysfunktion und Hypertonie führen kann (Auch-Schweik 1993, Bossaller 1989, Diederich 1992, Textor 1995). Obwohl die Mechanismen für diese unerwünschte Wirkungen bisher nicht hinreichend geklärt sind, gibt es experimentelle Hinweise, dass eine Calcineurininhibitor- induzierte Erhöhung der Superoxidradikal- Produktion innerhalb der Gefäßwand, zumindest teilweise, für die endothelialen Dysfunktion verantwortlich sein könnte: In bovinen Endothelzellen der Aorta (BAEC) bzw. in isolierten Aortenringen von Ratten wurde durch Behandlung mit CsA und FK 506 die Superoxidanionen-Produktion erhöht (Diederich 1994, Galle 2000, Lopez-Ongil 1998, Navarro-Antolin 1998, Parra 1998). Übereinstimmend mit diesen Daten konnten auch wir in humanen endothelialen Zellen mit dem Cytochrom C- Assay und der DCF- Fluoreszenz bestätigen, dass sowohl CsA, als auch FK 506, die ROS- Produktion erhöhen.

Die $O_2^{\cdot-}$ - bzw. ROS- Bildung wurde in der vorgelegten Arbeit mittels Cytochrom C- Assay bzw. der DCF-Fluoreszenz untersucht. Die Verwendung von zwei unabhängigen Messmethoden ist aufgrund der Problematik der methodischen Erfassung geringfügiger Konzentrationsänderungen von kurzlebigen

Sauerstoffradikalen in vaskulären Zellen nach unserer Auffassung notwendig:

Während die wenig sensitive Cytochrom C Methode spezifisch $O_2^{\cdot-}$ erfasst, wird durch die relativ unspezifische DCF- Fluoreszenz eine Reihe von ROS, u.a. $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , aber auch $ONOO^-$ gemessen (Brandes 2005, Tarpey 2003). Möglicherweise sind die z.T. unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Calcineurininhibitor-Wirkung (Tab.1 und 2) auf die unterschiedliche Radikalmessung zurückzuführen. Das ist der Grund, warum in den meisten Arbeiten zur $O_2^{\cdot-}$ - Messung zwei unterschiedliche Methoden zur Anwendung kommen, die prinzipiell vergleichbare Ergebnisse zeigen sollen (Brandes 2005, Tarpey 2003).

Anhand beider Methoden konnte nachgewiesen werden, dass CsA und FK 506, am stärksten bei einer Konzentration von 100nM, die $O_2^{\cdot-}$ - Bildung induzierten. Eine Inkubationszeit von 6 Stunden zeigte eine signifikante Steigerung der $O_2^{\cdot-}$ - Bildung, die bei längerer Inkubationsdauer (24 Stunden) nicht weiter verstärkt wurde.

Unsere Untersuchungen zeigen erstmalig, dass CsA und FK 506 die Aktivität der NAD(P)H- Oxidase steigern: Nach 6- stündiger Inkubation mit CsA bzw. FK 506 war die NAD(P)H- Oxidase Aktivität im Enzymaktivitätsassay in Lysaten von HUVEC deutlich erhöht. Um weitere Belege zum Einfluss von CsA und FK 506 auf die NAD(P)H- Oxidase zu erhalten, wurden HUVEC mit Inhibitoren der NAD(P)H- Oxidase – DPI und gp91ds-*tat* – behandelt. DPI ist ein unspezifischer Flavoprotein-Inhibitor, der nicht nur die NAD(P)H- Oxidase, sondern auch andere Enzymsysteme wie z.B. die Xanthinoxidase oder NO- Synthase hemmt (Doussiere 1992). DPI hemmte die Calcineurininhibitor- induzierte Steigerung der $O_2^{\cdot-}$ - Produktion deutlich. Aufgrund der unspezifischen Wirkung von DPI wurden zusätzlich Versuche mit dem spezifischen Inhibitor gp91ds-*tat* durchgeführt. gp91ds-*tat* ist ein Peptid, welches die NAD(P)H- Oxidase inhibiert, indem es die Zusammenlagerung zwischen der zytoplasmatischen Untereinheit p47^{phox} und der membran- gebundenen Untereinheit gp91^{phox} verhindert (Rey 2001, Pagano 2000). Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits früher zeigen, dass auch in Plättchen die $O_2^{\cdot-}$ - Produktion über die thrombozytäre NAD(P)H- Oxidase durch dieses Peptid verhindert werden kann (Krötz 2002). Durch die zusätzliche Behandlung der endothelialen Zellen mit gp91ds-*tat* konnte die CsA und FK 506- induzierte ROS- Produktion ebenfalls gehemmt werden. DPI zeigte zwar jeweils eine stärkere Wirkung als gp91ds-*tat*, ein Effekt, der vermutlich dosisabhängig ist.

In der vorgelegten Arbeit wurde nicht untersucht, über welche Mechanismen die Calcineurininhibitoren die NAD(P)H- Oxidase im Endothel aktivieren könnte. Galle et al. vermutete bereits, dass CsA die NAD(P)H- Oxidase aktiviert (Galle 2000), da sie beobachteten, dass die ROS- Erhöhung durch CsA Endothelin 1- abhängig vermittelt wird. Da Endothelin 1 in HUVEC die NAD(P)H-Oxidase aktivieren kann (Duerschmidt 2000), könnte dies eine mögliche Stufe in der Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase sein.

Unsere Daten zeigen insgesamt, dass CsA und FK 506 durch die Steigerung der NAD(P)H- Oxidase Aktivität die $O_2^{\cdot-}$ -Produktion in endothelialen Zellen erhöhen. Dadurch könnte die Bioverfügbarkeit von •NO im Endothel gesenkt und eine endotheliale Dysfunktion ausgelöst werden. Inwiefern CsA und FK 506 zusätzlich einen direkten Einfluss auf die NO- Synthase ausüben, ist bisher unklar und die Datenlage hierzu ist bisher widersprüchlich (Calo 2000, Gallego 1993, Lopez-Ongil 1998, Navarro 1998, Takeda 1999, Weis 2003).

E.4 Einfluss von Everolimus auf die $O_2^{\cdot-}$ - Produktion

In einer neueren Arbeit wurde nachgewiesen, dass ein immunsuppressives Regime mit Everolimus die Entwicklung einer TVP vermindern kann (Eisen 2003). Die genaueren zellulären Mechanismen, durch die Everolimus diese Auswirkungen auf die TVP entfaltet, sind bisher nicht vollständig geklärt.

Wir konnten in unseren Untersuchungen nicht eindeutig nachweisen, dass die protektiven Effekte von Everolimus über eine Hemmung der Superoxidanionen-Produktion vermittelt wird. Everolimus hatte in unterschiedlichen Konzentrationen und in beiden Methoden - Cytochrom C- Assay und DCF- Fluoreszenz - keine einheitlichen Wirkungen auf die $O_2^{\cdot-}$ - Bildung. Zudem zeigte der Proliferationshemmer Everolimus deutliche Effekte auf die Zellproliferation, so dass die Wirkung auf die $O_2^{\cdot-}$ - Produktion gegenüber der auf die Zellproliferation methodisch nicht sicher zu differenzieren war.

Da Everolimus direkt antiproliferativ auf glatte Muskelzellen wirkt (Cole 2000, Farb 2001), könnte dies eine der Ursachen für die protektive Wirkung von Everolimus gegenüber der Entwicklung einer TVP sein. Ob Everolimus die Endothelfunktion unabhängig von der $O_2^{\cdot-}$ - Bildung beeinflussen kann, ist bisher nicht bekannt.

E.5 Mycophenolsäure

E.5.1 Der Wirkmechanismus von Mycophenolsäure

Verglichen zu den Effekten der Calcineurininhibitoren verminderte MPA die NAD(P)H-Oxidase abhängige endotheliale $O_2^{\cdot-}$ - Produktion. Zum Verständnis der möglichen Mechanismen durch die MPA die NAD(P)H- Oxidase Aktivität beeinflussen könnte, soll zunächst die immunsuppressiven Wirkmechanismen von MPA vorgestellt werden.

Die Wirkung von Mycophenolat Mofetil (MMF) bzw. dessen aktiven Metaboliten Mycophenolsäure besteht in einer Hemmung der Purinsynthese in Lymphozyten, die essentiell für die Zellproliferation ist. Normalerweise kann Guanosinmonophosphat (GMP) auf zwei Wegen der Zelle verfügbar gemacht werden: Durch eine „de novo“-Synthese, in der in mehreren Schritten aus 5-Phosphoribosyl-1 Pyrophosphat (PRPP) Inosin-Monophosphat (IMP) entsteht, das wiederum durch das Enzym IMP-Dehydrogenase (IMPDH) NAD^+ - abhängig zu Xanthin- Monophosphat (XMP) katalysiert wird. Mit Hilfe der GMP- Synthase entsteht GMP, das in weiteren Schritten zu GTP oder dGDP für die DNA/RNA-Biosynthese metabolisiert wird (Löffler 1990). GTP spielt eine wichtige Rolle in der intrazellulären Signalverarbeitung und in der Glykoproteinbiosynthese. Eine Besonderheit der T- und B-Lymphozyten ist, dass sie im Gegensatz zu anderen Zellen vollständig vom diesem „de-novo pathway“ abhängig sind.

MPA hemmt die IMPDH nicht- kompetitiv und führt so zu einer Hemmung der Lymphozytenproliferation (Allison 2000, Allison 2002). Durch exogene Zugabe von Guanin oder Guanosin zu Lymphozyten oder Monozyten lässt sich in vitro die Reduktion des GTP- Spiegels vollständig rückgängig machen (Allison 2000). Durch eine Verminderung des GTP- Spiegels kommt es in Lymphozyten weiterhin zu einer verminderten Bildung von Adhäsionsmolekülen (Glykoproteinen), die eine wichtige Rolle beim Andocken der Lymphozyten an die endothelialen Zellen spielen (Blaheta 1999, Allison 1996). Interessanterweise wurde gezeigt, dass eine langfristige Inkubation mit MPA auch den GTP-Spiegel in Endothelzellen signifikant senken kann (Raab 2001). Verbunden war damit eine verminderte Expression von verschiedenen Adhäsionsmolekülen (Raab 2001, Blaheta 1998, Allison 1993, Huang 2005).

E.5.2 Die Wirkung von Mycophenolsäure auf endotheliale Zellen und die $O_2^{\cdot-}$ -Produktion

Im Gegensatz zu den Calcineurininhibitoren verminderte MPA die $O_2^{\cdot-}$ - Bildung in endothelialen Zellen. Die Wirkung trat nach langfristiger Vorinkubation mit MPA auf. Rodriguez-Iturbe et al. zeigte mit Hilfe immunhistochemischer Analysen in spontan hypertensiven Ratten, dass die Anzahl der $O_2^{\cdot-}$ - bildenden Zellen in Nieren-Glomeruli durch MPA gesenkt wird. In dieser Studie wurde allerdings nicht untersucht, ob dies eine Folge der immunsuppressiven Wirkung auf Lymphozyten, oder eine direkte Hemmung der $O_2^{\cdot-}$ - Produktion in Nierengewebe darstellt (Rodriguez-Iturbe 2001). Wir konnten in endothelialen Zellen zeigen, dass MPA direkt die $O_2^{\cdot-}$ - Produktion vermindert und dass dies auf eine Hemmung der NAD(P)H- Oxidase zurückzuführen ist: Die basale $O_2^{\cdot-}$ - Produktion konnte durch Zugabe der beiden NAD(P)H- Oxidase Inhibitoren DPI und gp91ds-*tat* signifikant vermindert werden. Nach langfristiger Vorinkubation mit MPA hingegen konnte keine zusätzliche Hemmung durch DPI und gp91ds-*tat* zur MPA- induzierten Verminderung der basalen $O_2^{\cdot-}$ - Produktion gezeigt werden. Dies weist darauf hin, dass der Anteil der von der NAD(P)H- Oxidase produzierten $O_2^{\cdot-}$ bereits durch MPA gehemmt wurde und so keine zusätzliche Inhibierung durch DPI oder gp91ds-*tat* erreicht werden konnte.

Zusätzlich untersuchten wir die Wirkung von MPA auf PMA-stimulierte endotheliale Zellen. PMA ist ein PKC-Aktivator und wird klassischerweise verwendet, um eine starke Aktivierung der NAD(P)H- Oxidase innerhalb weniger Minuten zu erreichen. Stimulation der Protein Kinase C und führt über eine Phosphorylierung von p47^{phox} und Aktivierung von Rac1 zu einer Zusammensetzung der Untereinheiten der NAD(P)H- Oxidase (Brandes 2005). Auch nach Aktivierung durch PMA wurde in unserer Studie die $O_2^{\cdot-}$ - Bildung durch MPA deutlich vermindert. Diese Verminderung wurde durch gp91ds-*tat* nicht weiter verstärkt. DPI hingegen führte zu einer weiteren signifikanten Verminderung der PMA-stimulierten $O_2^{\cdot-}$ - Produktion unter MPA Vorinkubation. Dieses Ergebniss ist vermutlich erneut auf die potentere Wirkung von DPI (30µM) verglichen zu gp91ds-*tat* zurückzuführen.

In neutrophilen Granulozyten ist die NAD(P)H- Oxidase die Hauptquelle für die Produktion von $O_2^{\cdot-}$ (De Leo 1996). Daher wurde überprüft, ob MPA in Neutrophilen ebenfalls die $O_2^{\cdot-}$ - Produktion beeinflusst, als einen Hinweis auf eine Beteiligung der NAD(P)H-Oxidase. In der Tat führte eine langfristige Inkubation von Neutrophilen mit MPA zu einer signifikanten Senkung der PMA- stimulierten $O_2^{\cdot-}$ - Bildung. Diese

Befunde weisen deutlich darauf hin, dass MPA die Aktivität der NAD(P)H- Oxidase direkt beeinflusst. Die unmittelbare Zugabe von MPA hatte keinen Effekt auf die $O_2^{\cdot-}$ -Bildung, so dass davon ausgegangen werden muss, dass MPA in die Signalwege zur Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase eingreift.

Im NAD(P)H- Oxidase Aktivitätsassay sollte ein zusätzlicher, direkter Nachweis des Einflusses von MPA auf die NAD(P)H- Oxidase Aktivität erbracht werden.

Überraschenderweise konnten wir in Lysaten von Endothelzellen keine Hemmung der NAD(P)H- abhängigen $O_2^{\cdot-}$ - Produktion feststellen. Möglicherweise kann der MPA-vermittelte Effekt nur in intakten Zellen nachgewiesen werden: MPA könnte die Bildung eines inhibitorischen Komponents induzieren, das während der Zelllyse verloren geht. Da NADH aber nicht membrangängig ist, ist eine Messung der NAD(P)H- Oxidase Aktivität nach Substratgabe in intakten Zellen nicht möglich. Bereits in früheren Studien konnte unserer Arbeitsgruppe beobachten, dass die Verminderung der endothelialen $O_2^{\cdot-}$ - Bildung, beispielsweise vermittelt über den Angiotensin II Rezeptor Typ 2, nur in intakten Zellen, jedoch nicht in Lysaten gemessen werden konnte (Sohn/ Raff 2000).

Da die Experimente insgesamt zeigten, dass MPA die NAD(P)H- Oxidase abhängige $O_2^{\cdot-}$ - Produktion hemmt, wurde in weiteren Schritten untersucht, ob dies durch eine reduzierte Expression des Enzyms oder durch eine verminderte Aktivierung des Enzyms zurückzuführen ist. Hierzu wurde die Expression der NAD(P)H- Oxidase Untereinheit $p22^{phox}$ mittels einer semiquantitativen RT-PCR untersucht. $p22^{phox}$ ist ein Teil des membran-gebundenen Cytochrom b558 Komplexes, der das Elektron von NADPH auf den Sauerstoff überträgt. Zur Aktivierung der NAD(P)H- Oxidase ist eine Interaktion von $p22^{phox}$ mit anderen Untereinheiten des Enzyms, insbesondere $gp91^{phox}$, essentiell (Brandes 2005). Wie in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte allerdings kein Unterschied in der Expression von $p22^{phox}$ zwischen den mit MPA vorbehandelten und den unbehandelten Zellen festgestellt werden (Sohn/Keller 2000). In nachfolgenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte in quantitativen real-time RT-PCRs ebenfalls kein Unterschied der Expression der NAD(P)H-Oxidase Untereinheiten $p47^{phox}$, Nox2 und Nox4 nachgewiesen werden (Krötz 2007).

Es liegen in der Literatur Befunde vor, dass MPA nicht nur in Lymphozyten, sondern auch in Endothelzellen den GTP-Spiegel vermindern kann (Raab 2001). Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass die Senkung des zellulären GTP-Spiegels im

Endothel auch die Funktion von kleinen G-Proteinen vermindern könnte (Allison 2000).

In der vorliegenden Arbeit fanden wir Hinweise, dass die Wirkung von MPA auf die NAD(P)H-Oxidase endothelialer Zellen in der Tat über eine Beeinflussung des kleinen G-Proteins Rac1 erklärt werden kann. In unseren Immunoblotanalysen konnten wir in MPA- inkubierten Zellen eine Abnahme der kleinen GTPase Rac1 im membrangebundenen Anteil der Zelle feststellen. Zusätzlich wurde in einem GTPase Aktivitäts- Assay eine verminderte Aktivität von Rac1 nach Behandlung mit MPA nachgewiesen.

Um eine direkte Abhängigkeit der Wirkung von MPA auf die Rac1- Aktivität und Menge nachzuweisen, wurden die mit MPA vorbehandelten Zellen zusätzlich mit Guanosin inkubiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Guanosin die durch MPA induzierte Hemmung der ROS- Produktion verhindert. In weiteren Versuchen unserer Gruppe konnte auch der beschriebene Effekt auf die Rac1- Aktivität durch Zugabe von exogenem Guanosin aufgehoben werden (Daten nicht gezeigt). Eine direkte Messung des zellulären GTP- Spiegels hingegen war aufgrund einer sehr niedrigen in- vitro Stabilität des Nucleotids methodisch nur eingeschränkt möglich. Daher zeigen die meisten Studien, die MPA- induzierte Wirkungen über Änderungen des zellulären GTP- Spiegel erklären, die Wirkung von MPA indirekt durch Zugabe von Guanosin (Hauser 1999, Mohacsi 1997, Raisanen-Sokolowski 1995).

Zusammenfassend haben unsere Untersuchungen erstmals gezeigt, dass MPA die endotheliale $O_2^{\cdot-}$ - Bildung über einen NAD(P)H-Oxidase abhängigen Mechanismus signifikant vermindert. MPA hemmte ebenfalls den über die NAD(P)H-Oxidase vermittelten „Respiratory burst“ in Neutrophilen. Die Transkription der NAD(P)H-Oxidase Untereinheiten blieb durch Gabe von MPA unverändert. Da eine Zugabe von Guanosin die MPA-induzierte Verminderung der $O_2^{\cdot-}$ - Bildung aufheben konnte, wird die Hypothese aufgestellt, dass MPA den GTP- Spiegel in Endothelzellen vermindert und somit die Funktion des kleinen G-Proteins Rac1, welches für die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase notwendig ist.

Diese Daten könnten eine mögliche pathophysiologische Erklärung für die jüngst veröffentlichten Daten von Kaczmarek et al. bieten, die klinisch eine verminderte Inzidenz der TVP bei Patienten zeigten, die mit einem immunsuppressivn Schema behandelt wurden, das MPA beinhaltet (Kaczmarek 2006).

F Zusammenfassung

Die Transplantatvaskulopathie ist eine häufige und gefürchtete Komplikation im Langzeitverlauf nach Herztransplantation. In den letzten Jahren wurden mehrere Studien veröffentlicht, die darauf hinweisen, dass die Progression der Transplantatvaskulopathie möglicherweise durch die Auswahl des Immunsuppressiva-Regimes beeinflusst werden kann. Die genauen zellulären Wirkmechanismen der Immunsuppressiva auf die Pathogenese der Transplantatvaskulopathie sind jedoch weitgehend unverstanden. Bekannt ist jedoch, dass die Transplantatvaskulopathie mit einer Verschlechterung der Stickstoffmonoxid(\bullet NO)-abhängigen Vasodilatation einhergeht, die sogenannte „Endotheldysfunktion“. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob verschiedene Immunsuppressiva (Cyclosporin A, FK 506, Everolimus und Mycophenolsäure) möglicherweise eine Endotheldysfunktion induzieren können. Dafür wurden in kultivierten humanen Endothelzellen (HUVEC) überprüft, ob die verschiedenen Immunsuppressiva eine vermehrte Bildung von Superoxidanionen auslösen. Superoxidanionen interagieren chemisch rasch mit \bullet NO und induzieren durch eine verminderte Bioverfügbarkeit von \bullet NO eine Endotheldysfunktion. Die Calcineurininhibitoren Cyclosporin A und FK 506 erhöhten in unseren Untersuchungen die endotheliale Superoxidanionen-Produktion deutlich und bestätigten damit bereits vorhandene Befunde anderer Arbeitsgruppen. Zusätzlich konnten wir erstmals direkt eine Beteiligung der NAD(P)H-Oxidase an der Erhöhung der Superoxidanionen-Produktion im Endothel nachweisen. Ein spezifischer NAD(P)H-Oxidase Inhibitor (gp91ds-tat) konnte die Effekte der Calcineurininhibitoren auf die NAD(P)H-Oxidase aufheben. Zusätzlich wurde direkt in einem NAD(P)H-Oxidase-Aktivitätsassay eine Steigerung der Enzymaktivität durch die Calcineurininhibitoren nachgewiesen.

Für den mTOR-Inhibitor Everolimus wurde in einer größeren klinischen Studie gezeigt, dass er die Inzidenz der Transplantatvaskulopathie nach Herztransplantation vermindern kann. Wir konnten zumindest in unseren Untersuchungen am Zellkulturmodell nicht nachweisen, dass diese Wirkung von Everolimus über eine Beeinflussung der Superoxidanionen-Bildung im Endothel vermittelt werden könnte. An unterschiedlichen experimentellen Ansätzen zur Bestimmung der Superoxidanionen-Produktion (Cytochrom C Assay bzw. DCF- Fluoreszenz) waren insgesamt keine einheitlichen Effekte von Everolimus auf die Superoxidanionen-

Produktion nachweisbar. Zusätzlich wurde durch Everolimus die Proliferation der Endothelzellen deutlich beeinflusst, so dass methodisch die Wirkungen von Everolimus auf die Superoxidanionen-Produktion versus Zellproliferation nicht sicher differenziert werden konnte.

Ein Hauptbefund der vorliegenden Arbeit ist, dass die Mycophenolsäure – im Gegensatz zu den Calcineurininhibitoren – die Superoxidanionen-Bildung in Endothelzellen signifikant verminderte. Wir fanden mehrere Hinweise darauf, dass die Effekte der Mycophenolsäure auf die Superoxidanionen über eine Hemmung der NAD(P)H-Oxidase vermittelt wird. Dabei war der inhibitorische Effekt von Mycophenolsäure auf die Superoxidanionen-Produktion sowohl in ruhenden als auch in durch Proteinkinase C aktivierten Endothelzellen nachweisbar. In beiden experimentellen Ansätzen hatte der spezifische NAD(P)H-Oxidase Inhibitor gp91ds-*tat* keine zusätzlich hemmenden Effekt auf die Superoxidanionen-Produktion, was vermuten lässt, dass die NAD(P)H-Oxidase bereits durch Mycophenolsäure nahezu vollständig gehemmt war. Weiterhin wurde der Einfluß von Mycophenolsäure auch auf die neutrophile NADPH-Oxidase überprüft. Mycophenolsäure schwächte den über die NAD(P)H-Oxidase induzierten „respiratory burst“ in neutrophilen Granulozyten ebenfalls signifikant ab.

Es wurden weitere Experimente zur Untersuchung der zellulären Mechanismen der Mycophenolsäure vermittelten Hemmung der NAD(P)H-Oxidase durchgeführt. Eine langfristige Inkubation der Endothelzellen mit Mycophenolsäure veränderte die transkriptionelle Expression von NAD(P)H-Oxidase Untereinheit nicht. Vielmehr konnten wir Befunde erheben, dass die inhibitorische Wirkung von Mycophenolsäure auf die Superoxidanionen- Produktion durch eine Hemmung der kleinen GTPase Rac1 vermittelt wird. Rac1 ist ein Bestandteil von vaskulären NAD(P)H-Oxidasen und ist für eine vollständige Aktivierung des Enzyms von essentieller Bedeutung.

Mycophenolsäure hemmte in unseren Versuchen sowohl die Membrantranslokation von Rac1 als auch die GTP-abhängige Überführung in die aktive Rac1-Variante, die durch spezielle Rac1-Aktivitätsassays nachgewiesen werden konnte. Die Hypothese, dass die Mycophenolsäure die Rac1-Aktivität durch eine zelluläre Depletion von GTP hemmt wurde experimentell insofern gestützt, da eine parallele Inkubation mit Guanosin, die zu einer Auffüllung des zellulären GTP-Pools führt, die hemmende Wirkung der Mycophenolsäure auf die Superoxidanionen- Produktion in Endothelzellen vollständig aufhob.

Zusammenfassend lassen die Daten der vorgelegten Arbeit schlussfolgern, dass die derzeit bei herztransplantierten Patienten verwendeten Immunsuppressiva durchaus unterschiedliche Effekte auf die Superoxidanionen-Produktion in Endothelzellen ausüben. Interessant ist, dass die Mycophenolsäure den oxidativen Stress im Endothel reduziert, während die Calcineurininhibitoren eher steigernd wirken. Es kann postuliert werden, dass die Mycophenolsäure durch ihre antioxidative Wirkung dazu beitragen kann, der Entwicklung einer Endotheldysfunktion entgegenzuwirken. Dies könnte pathogenetisch eine mögliche Erklärung dafür sein, dass in klinischen Studien beobachtet wird, dass bei herztransplantierten Patienten ein immunsuppressives Regime mit Mycophenolsäure die Progression der Transplantatvaskulopathie vermindert. Aufgrund der hier dargestellten unterschiedlichen Auswirkungen der Immunsuppressiva auf die Endothelfunktion, insbesondere auf die NAD(P)H-Oxidase-abhängige Superoxidanionen-Produktion, sollte die Mycophenolsäure vermehrt zur Verbesserung der Endothelfunktion und zur Therapie der Transplantatvaskulopathie in Betracht gezogen werden.

G Literaturverzeichnis

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002): Molecular Biology Of The Cell (4.Auflage). *Garland Science*

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001): Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* **357** (pt.3), 593-615

Allison AC, Kowalski WJ, Muller CJ (1993): Mycophenolic acid and brequinar, inhibitors of purine and pyrimidine synthesis, block the glycosilation of adhesion melocules. *Transplant Proc* **25** (Suppl 2):67-70

Allison AC, Eugui EM (1996): Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). *Clin Transplant* **10** (1Pt2):77-84

Allison AC, Eugui EM (2000): Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* **47**: 85-118

Allison AC (2002): Mechanism of action of mycophenolate mofetil in preventing chronic rejection. *Transplant Proc* **34**(7):2863-6

Anderson TJ (1999): Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol* **34**: 631-637.

Arai S, Teramoto S, Senoo Y (1992): The impact of FK 506 on graft coronary disease of rat cardiac allograft- a comparison with cyclosporine. *J Heart Lung Transplant* **11** (4 Pt 1):757-62

Auch-Schwelk W, Bossaller C, Götze S, Thelen J, Fleck E (1993): Endothelial and vascular smooth muscle function after chronic treatment with cyclosporin A. *J Cardiovasc Pharmacol.* **21**: 435-440.

Avdonin PV, Cottet-Maire F, Afanasjeva GV, Loktionova SA, Lhote P, Ruegg UT (1999): Cyclosporine A up-regulates angiotensin II receptors and calcium responses in human vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* **55**(6): 2407-14

Azuma H, Binder J, Heemann U, Schmid C, Tullius SG, Tilney NL(1995): Effects of RS61443 on functional and morphological changes in chronically rejecting rat kidney allografts. *Transplantation* **59**: 460-466.

Babior BM (1999): NADPH oxidase: An update. *Blood* **93** :1464-1476

Barbacanne MA, Souchard JP, Darblade B, Iliou JP, Nepveu F, Pipy B, Bayard F, Arnal JF (2000): Detection of superoxide anion released extracellularly by endothelial cells using cytochrome c reduction, ESR, fluorescence and lucigenin-enhanced chemiluminescence techniques. *Free Radic Biol med* **29**: 388-396.

Bassermann F, Jahn T, Miething C, Seipel P, Bai RY, Coutinho S, Tybulewicz VL, Peschel C, Duyster J (2002): Association of bcr-Abl with the Proto-oncogene Vav Is Implicated in Activation of the rac-1 Pathway. *J Biol Chem* **277**(14): 12437-12445

Benvenuti C, Aptekar E, Mazzucotelli JP, Jouannot P, Loisanse D, Nitenberg A (1995): Coronary artery reponse to cold-pressure test is impaired early after operation in heart transplant recipients. *J Am Coll Cardiol* **26**: 446-451.

Berk BC (2001): Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev* **81**: 999-1030.

Blaheta RA, Leckel K, Wittig B, Zenker D, Oppermann E, Harder S, Scholz M, Weber S, Schuldes H, Encke A, Markus BH (1998): Inhibition of endothelial receptor expression and T-cell ligand activity by mycophenolate mofetil. *Transplant Immunology* **6**: 251-259

Bokoch GM (1994): Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the rac GTP-binding proteins. *Current Opinion in Cell Biology* **6**: 212-218

Bokoch GM, Diebold BA (2002): Current molecular models for NADPH oxidase regulation by rac GTPase. *Blood* **100**: 2692-2696

Bossaller C, Förstermann U, Hertel R, Olbricht C, Reschke V, Fleck E (1989): Cyclosporine A inhibits endothelium-dependent vasodilatation and vascular prostacyclin production. *Eur J Pharmacol* **165**: 165-169.

Brandes RP, Janiszewski M (2005): Direct detection of reactive oxygen species ex vivo. *Kidney int* **67**(5): 1662-4

Brandes RP, Kreuzer J (2005): Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovascular Research* **65**: 16-27

Cai H, Harrison DG (2000): Endothelial dysfunction in Cardiovascular Diseases. *Circulation Research* **87**: 840-844

Calo L, Semplicini A, Davis PA, Bonvici P, Cantaro S, Rigotti P, D'Angelo A, Livi U, Antonello A (2000): Cyclosporin-induced endothelial dysfunction and hypertension: are nitric oxide system abnormality and oxidative stress involved? *Transpl Int* **13** (Suppl 1): 413-418

Cole OJ, Shehata M, Rigg KM (1998): Effect of SDZ RAD on transplant arteriosclerosis in the rat aortic model. *Transplant Proc* **30**: 2200

Cosentino F, Patton S, d'Uscio LV, Werner ER, Werner-Felmayer G, Moreau P, Malinski T, Luscher TF (1998): Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest* **101**:1530-1537.

Davis Sf, Yeung AC, Meredith IT, Charbonneau F, Ganz P, Selwyn AP, Anderson TJ (1996): Early endothelial dysfunction predicts the development of transplant coronary artery disease 1 year posttransplant. *Circulation* **93**: 457-462.

De Keulenaer GW, Chappell DC, Ishizaka N, Nerem RM, Alexander RW, Griendling KK (1998): Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of superoxide-producing NADH oxidase. *Circ Res* **82**: 1094-1101.

De Leo FR, Quinn MT (1996): Assembly of the phagocyte NADPH-Oxidase: Molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukoc Bio* **60**: 677-91

Deng MC, Plenz G, Erren M, Wilhelm MJ, Moenning G, Rothenburger M, Baba HA (2000): Transplant Vasculopathy: a model for Coronary Artery Disease? *Herz* **25**: 95-99

Diederich D, Yang Z, Lüscher TF (1992): Chronic cyclosporine therapy impairs endothelium-dependent relaxation in the renal artery of the rat. *J Am Soc Nephrol* **2**: 1291-1297.

Diederich D, Skopec J, Diederich A, Dai FX (1994): Cyclosporine produces endothelial dysfunction by increased production of superoxide. *Hypertension* **23** (6 Pt 2):957-61.

- Drexler H, Fischell TA, Pinto FJ, Chenzbraun A, Botas J, Cooke JP, Alderman EL (1994): Effect of L-arginine on coronary endothelial function in cardiac transplant recipients: relation to vessel wall morphology. *Circulation* **89**: 1615- 1623
- Doussiere J, Vignais PV (1997): Diphenylene iodonium as an inhibitor of the NADPH-Oxidase complex in bovine neutrophils. Factors controlling the inhibitory potency of diphenylene iodonium in a cell-free system of oxidase activation. *Eur J Biochem* **208**: 61-71
- Duerrschmidt N, Wippich N, Goettsch W, Broemme HJ, Morawietz H (2000): Endothelin-1 induces NAD(P)H- Oxidase in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **24**: 269(3): 713-7
- Dunn C, Croom KF (2006): Everolimus- A review of its use in renal and cardiac Transplantation. *Drugs* **66**(4):547-570
- Eisen H, Ross H (2004): Optimizing the immunosuppressive regimen in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. **23**(5 Suppl): S 207-13
- Eisen HJ, Tuzcu EM, Dorent R (2003): Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med*. **349**: 847
- Eisen HJ, Kobashigawa J, Keogh A, Bourge R, Renlund D, Mentzer R, Aldermann E, Valentine H, Dureau G, Mancini D, Mamelok R, Gordon R, Wang W, Mehra M, Constanzo MR, Hummel M, Johnson J (2005): Three years results of the randomized, double blind, controlled trial of mycophenolate mofetil vs azathioprine in cardiac transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* **24**(5):517-25
- Farb A, John M, Acampado E (2001): Oral everolimus inhibits in-stent neointimal growth. *Circulation* **106**: 2379
- Fish RD, Nabel EG, Selwyn AP, Ludmer PL, Mudge GH, Kirsshenbaum JM, Schoen FJ, Alexander RW, Ganz P (1988): Response of coronary arteries of transplant patients to acetylcholine. *J Clin Invest* **81**: 21-31
- Freudenberger R, Alexis J, Gass A, Fuster V, Badimon J (1999): Antithrombotic Effect of FK 506 vs Cyclosporine in Cardiac Transplant Recipients: Potential Implications in Transplant Arteriopathy. *J Heart Lung Transplant* **18**: 1228-1231
- Frey RS, Rahman A, Kefer JC, Minshall RD, Malik AB (2002): PKC ζ regulates TNF α – induced activation of NADPH oxidase in endothelial cells. *Circ res* **90**: 1012-1019.
- Galle J, Lehmann-Bodem C, Hübner U, Heinloth A, Wanner C (2000): CsA and Ox LDL cause endothelial dysfunction in isolated arteries through endothelin- mediated stimulation of O $_2^-$ formation. *Nephrol Dial Transplant* **15**: 339-346
- Gallego MJ, Farre AL, Cernadas MR, Barron MP, Caramelo C (1993): Effects of cyclosporine on endothelial cells. *J Am Soc Nephrol* **4**: 550a. AbstRact
- Goggins WC, Fisher RA, Cohen DS, Tawes JW, Grimes MM (1996): Effect of single-dose - based immunosuppression on the development of cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* **15**(8):790
- Greenstein SM, Sun S, Calderon TM, Kim DY, Schreiber TC, Schechner RS, Tellis VA, Berman JW (2000): Mycophenolate Mofetil Treatment Reduces Atherosclerosis in the Cholesterol-Fed Rabbit. *Journal of Surgical Research* **91**: 123-129

- Gregg D, Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont (2003): Rac regulates cardiovascular superoxide through diverse molecular interactions: more than a binary GTP switch. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**(4): C723-34
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000): NADPH Oxidase- Role in Cardiovascular Biology and Disease. *Circ Res*. **86**: 494-501
- Hartmann A, Weis M, Olbrich HG, Cieslinski G, Schacherer C, Burger W, Beyersdorf F, Schröder R (1994): Endothelium-dependent and endothelium-independent vasomotion in large coronary arteries and in the microcirculation after cardiac transplantation. *Eur Heart J* **15**: 1486-1493.
- Hauser IA, Renders L, Radeke HH, Sterzel B, Goppelt-Straube M (1999): Mycophenolate mofetil inhibits rat and human mesangial cell proliferation by guanosine depletion. *Nephrol Dial Transplant* **14**: 58-63
- Heitzer T, Brockhoff C, Mayer B, Warnholtz A, Mollnau H, Henne S, Meinertz T, Munzel T (2000): Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers: evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Circ Res* **86**: E36-E41
- Hollenberg SM, Klein LW, Parrillo JE (2004): Changes in coronary endothelial function predict progression of allograft vasculopathy after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* **23**: 265
- Holvoet P, Van Cleemput J, Collen D, Vanhaecke J (2000): Oxidized low lipoprotein is a prognostic marker of transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(3): 698-702
- Huang Y, Liu Z, Huang H, Liu H, Li L (2005): Effects of mycophenolic acid on endothelial cells. *International Immunopharmacology* **5**: 1029-1039
- Hummel M (2005): Recommendations for Use of Certican (Everolimus) After Heart Transplantation: Results from a German and Austrian Consensus Conference. *J Heart Lung Transplant* **24**(4 Suppl): S196-200
- Hutchinson IV (2000): Cardiac allograft vasculopathy- the cellular attack. *Z Kardiol* **89**: Suppl 9 IX/16-IX/20
- Iwata A, Sai S, Moore M, Nyhuis J, de Fries-Hallstrand R, Quetingco GC, Allen MD (2000): Gene therapy of transplant arteriopathy by liposome-mediated transfection of endothelial nitric-oxide synthase. *J Heart Lung Transplant* **19**(11): 1017-1028
- Johnson DE, Gao SZ, Schroeder JS (1989): The spectrum of coronary artery pathologic findings in human cardiac allografts. *J Heart Transplant* **88**: 349-359
- Kaczmarek I, Ertl B, Schmauss D, Sadoni S, Knez A, Daebritz S, Meiser B, Reichart B (2006): Preventing cardiac allograft vasculopathy: long-term beneficial effects of mycophenolate mofetil. *Heart Lung Transplant*. **25**(5): 550-6
- Kato T, Chen MC, Gao SZ (2004): Glucose intolerance, as reflected by hemoglobin A1c level, is associated with the incidence and severity of transplant artery disease. *J Am Coll Cardiol* **43**: 1034
- Keogh A (2004): Calcineurin inhibitors in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* **23** (5 Suppl): S202-6

- Keogh A, Richardson M, Ruygrok O, Spratt P, Galbraith A, O'Driscoll G, Macdonald P, Esmore D, Muller D, Faddy S (2004): Sirolimus in de novo heart transplant recipients reduces acute rejection and prevents coronary artery disease at 2 years: a randomized clinical trial. *Circulation* **110** (17): 2694-700.
- Kitazono T, FaRaci FM, Heistad DD (1996): L-arginine restores dilator responses of the basilar artery to acetylcholine during chronic hypertension. *Hypertension* **27**: 893-896
- Klauss V, König A, Spes C, Meiser B, Rieber J, Siebert U, Regar E, Pfeiffer M, Reichart B, Theisen K, Mudra H (2000): Cyclosporine Versus Tacrolimus (FK 506) for Prevention of Cardiac Allograft Vasculopathy. *The American Journal of Cardiology* **85**: 266-269
- Kobashigawa J (2000): What is the optimal prophylaxis for treatment of cardiac allograft vasculopathy? *Curr Control Trials Cardiovasc Med* **1**:166-171
- Kobashigawa JA (2004): Statins and cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation. *Semin Vasc Med* **4**(4): 401-6
- Kobashigawa JA, Meiser BM (2005): Review of major clinical trials with mycophenolate mofetil in cardiac transplantation. *Transplantation* **80**(2 Suppl): S 235-43.
- Kobashigawa JA, Tobis JM, Mentzer RM, Valantine HA, Bourge RC, Mehra MR, Smart FW, Miller LW, Tanaka K, Li H, Gjertson DW, Gordon RD (2006): Mycophenolate Mofetil reduces intimal thickness by intravascular ultrasound after heart transplantation: reanalysis of the multicenter trial. *Am J Transplant* **6** (5Pt1): 993-7
- Krotz F, Sohn HY, Gloe T, Zahler S, Riexinger T, Schiele TM, Becker BF, Theisen K, Klauss V, Pohl U. NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood* 2002; **100**(3):917-924
- Krötz F, Keller M, Derflinger S, Schmid H, Gloe T, Bassermann F, Duyster J, Cohen C, Schuhmann C, Klauss V, Pohl U, Stempfle HU, Sohn HY (2007): Mycophenolate Acid Inhibits Endothelial NAD(P)H-Oxidase Activity And Superoxide Formation by a Rac1 dependent Mechanism. *Hypertension* **49**: 201-208
- Landmesser U, Cai, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, Holland SM, Harrison DG (2002): Role of p47phox in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension* **40**: 511-515.
- Lassègue B, Clempus R (2003): Vascular NADPH oxidases: specific features, expression and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**: R277-R297
- Lassègue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SI, Lambeth JD, Griending KK (2001): Novel gp91phox homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensinII- induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ res* **88**: 888-894.
- Lee PC, Wang ZL, Qian S, Watkins SC, Lizonova A, Kovesdi I, Tzeng E, Simmons RL, Billiar TR, Shears LL (2000): Endothelial nitric oxide synthase protects aortic allografts from the development of transplant arteriosclerosis. *Transplantation*, **69**:1186-1192
- Li JM, Shah AM (2004): Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**: R1014-R1030
- Löffler G, Petrides PE (1990): Biochemie und Pathobiochemie, 5.Auflage

- Lopez-Ongil S, Hernandez-Perera O, Navarro- Antolin J, Perez de Lema G, Prodriguez-Puyol M, Lamas S, Rodriguez-Puyol D (1998): Role of reactive oxygen species in the signalling cascade of cyclosporine A-mediated up- regulation of eNOS in vascular endothelial cells. *British Journal of Pharmacology* **124**: 447-454
- Lyle AN, Griendling KK (2006): Modulation of Vascular Smooth Muscle Signaling by Reactive Oxygen Species. *Physiology* **21**: 269-280
- Mancini D, Pinney S, Burkhoff D, La Manca J, Itescu S, Burke E, Edwards N, Oz M, Marks AR (2003): Use of Rapamycin Slows Progression of Cardiac Transplantation Vasculopathy. *Circulation* **108**: 48-53
- Marui N, Offerman M, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM (1993): Vascular cell-adhesion molecule- 1 (VCAM-1) gene- transcription and expression are regulated through an antioxidant sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* **92**: 1866-1874.
- Matsumoto Y, Hof A, Baumlin Y, Hof RP (2003): Differential effect of cyclosporine A and SDZ RAD on neointima formation of carotid artery allografts in apolipoprotein E- deficient mice. *Transplantation* **76**:1166
- Mehra MR, Ventura HO, Smart FW, Stapleton DD (1995): Impact of converting enzyme inhibitors and calcium entry blockers on cardiac allograft vasculopathy: from bench to bedside. *J Heart Lung Transplant* **14**: S246-249
- Meiser BM, von Scheidt W, Weis M, Böhm D, Kur F, Koglin J, Reichenspurner H, Überfuhr P, Reichart B (1997): Herztransplantation- State of the Art today. *Herz* **22**(5):237-52
- Meiser BM, Reichart B (1993): Graft vessel disease: The impact of immunosuppression and possible treatment strategies. *Immunological Reviews* **134**: 99-116
- Meyer JW, Holland JA, Ziegler LM, Chang MM, Beebe G, Schmitt ME (1999): Identification of a Functional Leukocyte-Type NADPH Oxidase in Human Endothelial Cells: A Potential Atherogenic Source of Reactive Oxygen Species. *Endothelium* **7**(1): 11-22
- Mohacsi PJ, Tuller D, Hulliger B, Wijngaard PL (1997): Different inhibitory effects of immunosuppressive drugs on human and rat aortic smooth muscle and endothelial cell proliferation stimulated by platelet-derived growth factor or endothelial growth facot. *J Heart Lung Transplant* **16**: 484-492
- Moien-Afshari F, McManus BM, Laher I (2003): Immunosuppression and transplant vascular disease: benefit and adverse effects. *Pharmacol Ther.* **100**(2):141-56
- Mügge A, Heublein B, Kuhn B, Nolte C, Haverich A, Warnecke J, Forrsmann WG, Lichtlen PR (1993): Impaired coronary dilator response to substance P and impaired flow-dependent dilator responses in heart transplant patientswith graft vasculopathy. *J Am Coll Cardiol* **21**: 163-171
- Navarro-Antolin J, Hernandez-Perera O, Lopez-Ongil S, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D, Lamas S (1998): CsA and FK506 up- regulate eNOS expression: Role of reactive oxygen species and AP-1. *Kidney International* **54** (Suppl.68): S20-S24
- Napoli C, Ignarro LJ (2001): Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric oxide* **5**: 88-97
- Nicchitta CV, Kamoun M, Williamson JR (1985): Cyclosporine augments receptor-mediated cellular Ca²⁺ fluxes in isolated hepatocytes. *J Biol Chem* **5**;260(25):13613-8.

Nickel T, Schlichting CL, Weis M (2006): Drugs Modulating Endothelial Function after Transplantation. *Transplantation* **82** (Suppl.1): S41-S46

Okada K, Nishida Y, Murakami H, Sugimoto I, Kosaka H, Morita H, Yamashita C, Okada M (1998): Role of endothelin in the development of graft arteriosclerosis in rat cardiac allografts. *Circulation* **97**: 2346-2351.

Pagano PJ (2000): Vascular gp 91 phox- Beyond the Endothelium. *Circulation Research* **87**: 1-3

Parra T, De Arriba G, Arribas I, de Lema GP, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M (1998): Cyclosporine A nephrotoxicity: Role of thromboxane and reactive oxygen species. *J Lab Clin Med* **131**: 63-70

Preumont N, Lenaers A, Goldman S, Vachier JL, Wikler D, Damhaut P, Degre S, Berkenboom G (1996): Coronary vasomotility and myokardial blood flow early after heart transplantation. *Am J Cardiol* **78**: 550-554.

Quiroz Y, Pons H, Gordon KL, Rincon J, Chavez M, Parra G, Herrera-Acosta J, Gomez-Garre D, Largo R, Egido J, Johnson RJ, Rodriguez- Iturbe (2001): Mycophenolate Mofetil prevents salt- sensitive hypertension resulting from nitric oxide synthesis inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**: F38-F47

Raab M, Daxecker H, Karimi A, Markovic S, Cichna M, Markl P, Müller MM (2001): In vitro effects of mycophenolic acid on the nucleotide pool and on the expression of adhesion molecules of human umbilical vein endothelial cells. *Clinica Chimica Acta* **310**: 89-98

Raisanen- Sokolowski A, Vuoristo P, Myllärniemi M, Yilmaz S, Kallio E, Häyry P (1995): Mycophenolate mofetil (MMF, RS-61443) inhibits inflammation and smooth muscle cell proliferation in rat aortic allografts. *Transplant Immunology* **3**: 342-351

Ravalli S, Szaboles M, Albala A, Mitchler RRE, Cannon PJ (1996): Increased immunoreactive endothelin-1 in human transplant coronary artery disease. *Circulation* **94**: 2096-2102.

Ray R, Shah AM (2005): NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clinical Science* **109**: 217-226

Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT, Pagano PJ (2001): Novel Competitive Inhibitor of NADPH Oxidase Assembly Attenuates Vascular O₂⁻ and Systolic Blood Pressure in Mice. *Circ Res* **89**: 408-414

Rodriguez-Iturbe B, Pons H, Quiroz Y, Gordon K, Rincon J, Chavez M, Parra G, Herrera-Acosta J, Gomez- Garre D, Large R, Egido J, Johnson RJ (2001): Mycophenolate mofetil prevents salt-sensitive hypertension resulting from angiotensin-II exposure. *Kidney International* **59**: 2222-2232

Romero F, Rodriguez- IturbeB, Pons H, Parra G, Quiroz Y, Rincon J, Gonzalez L (2000): Mycophenolate mofetil treatment reduces cholesterol- induced atherosclerosis in the rabbit. *Atherosclerosis* **152**: 127-133

von Scheidt W (2000): Cardiac allograft vasculopathy- problem and model. *Z Kardiol* **89** (Suppl.9): IX/2- IX/5

Scherrer U, Vissing SF, Morgan BJ, Rollins JA, Tindall RSA, Ring S, Hanson P, Mohanty PK, Victor RG (1990): Cyclosporine- induced sympathetic activation and hypertension after heart transplantation. *N Engl J Med* **323**: 693-699

Schroeder JS, Gao SZ, Alderman EL (1993): A preliminary study of diltiazem in the prevention of coronary artery disease in heart-transplant recipients. *N Engl J Med* **328**: 164

Schuurmann HJ, Pally C, Weckbecker G (1999): SDZ RAD inhibits cold ischemia-induced vascular remodelling. *Transplant Proc* **31**: 1024

Sehgal SN (1995): Rapamune (Sirolimus, Rapamycin): an overview and mechanism of action. *Ther Drug Monit* **17**: 660-5

Seshiah PN, Weber DS, Rocie P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK (2002): Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res* **91**:406-413.

Skorecki KL, Rutledge WP, Schrier RW (1992): Acute cyclosporine nephrotoxicity: prototype for a renal membrane signalling disorder. *Kidney Int* **42**: 1-10.

Smith KR, Klei LR, Barchowsky AC (2001): Arsenite stimulates plasma membrane NADPH oxidase in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.**280**: L442-L449.

Sohn HY, Keller M, Gloe T, Morawietz H, Rueckschloss U, Pohl U (2000): The Small G-Protein Rac Mediates Depolarization- induced Superoxide Formation in Human Endothelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry* **275**(25): 18745-18750

Sohn HY, Raff U, Hoffmann A, Gloe T, Heermeier K, Galle J, Pohl U (2000): Differential role of angiotensin II receptor subtypes on endothelial superoxide formation. *British Journal of Pharmacology* **13**: 667- 672

Sohn HY, Krotz F, Gloe T, Keller M, Theisen K, Klauss V, Pohl U (2003): Differential regulation of xanthine and NAD(P)H oxidase by hypoxia in human umbilical vein endothelial cells. Role of nitric oxide and adenosine. *Cardiovascular research* **58**: 638-646

Somers MJ, Burchfield JS, Harrison DG (2000): Evidence for a NADH/NADPH oxidase in human umbilical vein endothelial cells using electron spin resonance. *Antioxid Redox Signal* **2**: 779-787.

Takeda Y, Miyamori I, Furukawa K, Inaba S, Mabuchi H (1999): Mechanisms of FK 506- Induced Hypertension in the Rat. *Hypertension* **33**: 130-136

Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB (2003): Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**: R431-R444

Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM (2005): Registry of the international Society for Heart and Lung Transplantation:twenty-second official adult heart transplant report. *J Heart Lung Transplant* **24**: 945

Textor SC, Burnett JC Jr, Romero JC, Canzanella VJ, Taler SJ, Wiesner R, Porayko M, Krom R, Gores G, Hay E (1995): Urinary endothelin and renal vasoconstriction with cyclosporine or FK506 after liver transplantation. *Kidney Int* **47**(5):1426-33.

Uchida J, Miura K, Yamanaka S, Kim S, Iwao H, Nakatani T, Kishimoto T(1998): Renal endothelin in FK506-induced nephrotoxicity in spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol* **76**(1):39-49.

Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters S, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA (1998): Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9220-9225

Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, MacHarzina R, Brasen JH, Skatchov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Bohm M, Meinertz T, Munzel T (1999): Increased NADH-Oxidase mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* **99**: 2027-2033.

Weis M, von Scheidt W (1997): Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Circulation* **96**(6): 2069-2077.

Weis M, Wolf WP, Mazilli N, Olbrich HG, Burger W, Hartmann A (1997): Variations of segmental endothelium dependent and endothelium independent vasomotor tone in the long term follow up after cardiac transplantation (qualitative changes in endothelial function). *Am Heart J* **134**: 306-315.

Weis M, Wildhirt SM, Schulze C, Rieder G, Wilbert- Lampen U, Wolf WP, Arendt RM, Enders G, Meiser BM, von Scheidt W (1999): Endothelin in Coronary Endothelial Dysfunction Early After Human Heart Transplantation. *J Heart Lung Transplant* **18**: 1071-1079

Weis M, Wildhirt SM, Schulze C, Pehlivanli S, Rieder G, Wolf WP, Wilbert- Lampen U, Meiser BM, Enders G, von Scheidt W (2000): Coronary Vasomotor Dysfunction in the Cardiac Allograft: Impact of Different Immunosuppressive Regimes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **36**: 776-784

Weis M, Pehlivanli S, Meiser BM, von Scheidt W (2001): Simvastatin treatment is associated with improvement in coronary endothelial dysfunction and decreased cytokine activation in patients after heart transplantation. *J Am Coll Cardiol* **38**(3): 814-818

Weis M, Cooke JP (2003): Cardiac Allograft Vasculopathy and Dysregulation of the NO Synthase Pathway. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* **23**: 567-575

Wenke K, Meiser B, Thiery J, Nagel D, von Scheidt W, Steinbeck G, Seidel D, Reichart B (1997): Simvastatin reduces graft vessel disease and mortality after heart transplantation: a 4-year randomized trail. *Circulation* **96**: 1398-1402.

Winters G, Kendall TJ, Radio SJ, Wilson JE, Costanzo-Norden MR, Switzer BL, Remmenga JA, McManus BM (1990): Post-transplant obesity and hyperlipidemia: major predictors of severity of coronary arteriopathy in failed human heart allografts. *J Heart Lung Transplant* **9**: 364-371

Wolin MS, Gupte SA, Oeckler RA. Superoxide in the vascular system. *J Vasc Res* 2002; **39**(3):191-207

Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK (1998): Novel role of NADH/NADPH oxidase-derived hydrogen peroxide in angiotensin II-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **32**: 488- 495.

Zhang W, Victor RG (2000): Calcineurin Inhibitors Cause Renal Afferent Activation in Rats: A Novel Mechanism of Cyclosporine- Induced Hypertension. *American Journal of Hypertension* **13**: 999-1004

H Abkürzungsverzeichnis

CsA	Cyclosporin A
CytC	Cytochrom C
DCF	2,7 dihydrodichlorofluorescein
DPI	Diphenyleneiodonium-Chlorid
FK 506	= Tacrolimus
GDI	Guanindissoziations-Inhibitoren
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktoren
GMP/GDP/GTP	Guanosinmono/di/triphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
Htx	Herztransplantation
IMPDH	Inosinmonophosphat-Dehydrogenase
L-NA	L-Nitro-Arginin
MPA	Mycophenolsäure
NO	Nitric oxide
NOS	NO-Synthase
eNOS	endotheliale NOS
Nox	NAD(P)H-Oxidase
oxLDL	oxidiertes LDL
PAK	p21-aktivierte Kinase
PBD	p21-bindende Domäne
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
SOD	Superoxiddismutase
TNF	Tumor necrosis factor
TVP	Transplantatvaskulopathie
XMP	Xanthinmonophosphat

I Lebenslauf

□ Persönliche Daten

Name: Sabine Derflinger
 Anschrift: Gozbertstr.3, 81547 München
 e-mail: SabineDerflinger@web.de
 Geburtsdatum/ort: 13.07.1979 in München
 Familienstand: ledig

□ Schulbildung

1985-1989: Volksschule Aschheim
 1989-1998: Gymnasium Kirchheim bei München
 Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

□ Hochschulbildung

Seit 11/1998: Studium der Humanmedizin an der LMU München
 Seit 10/2000: Wechsel an die TU München
 08/2000: Ärztliche Vorprüfung
 03/2002: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 03/2004: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 05/2005: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 31.5.2005: Approbation
 seit 10/05: Assistenzärztin am Krankenhaus Harlaching, Abteilung für Neurologie

München, 1.10.2007

Sabine Derflinger

J Danksagung

Herrn Prof.Dr. U Pohl möchte ich für die Überlassung der Thematik und die Möglichkeit der Bearbeitung der Thematik in seinem Institut danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. HY Sohn, der mich durch seine konstruktive und kritische Anleitung und seine fachliche Beratung hilfreich unterstützte. Herrn Dr. M. Keller und Herrn Dr. F. Krötz möchte ich für ihre individuelle Unterstützung und Betreuung bei den praktischen Arbeiten im Labor danken. Herzlich danken möchte ich auch Herrn Dr. T. Gloe für seine große Unterstützung und unendliche Geduld.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, im Speziellen Herrn N.Uez und Frau M. Hien, die mich stets ermutigten und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.